

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de biologie animale
Département de physiologie

FACULTE DES SCIENCES
FACULTE DE MEDECINE

**Mouvements de ^{45}Ca
dans la neurohypophyse
en rapport avec la sécrétion hormonale**

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

Jean NORDMANN

de

Bâle-Ville

Thèse N° 1614

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1973

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de biologie animale
Département de physiologie

FACULTE DES SCIENCES
FACULTE DE MEDECINE

**Mouvements de ^{45}Ca
dans la neurohypophyse
en rapport avec la sécrétion hormonale**

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

Jean NORDMANN

de

Bâle-Ville

Thèse N° 1614

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1973

La Faculté des sciences, sur le préavis du professeur J.J. Dreifuss (Faculté de médecine), directeur scientifique, du professeur H. Huggel, responsable devant la Faculté et du professeur F. Morel (Collège de France, Paris), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 26 juin 1973

Le doyen:
Jean Muller

Thèse No 1614



A MES PARENTS

A PIERRE

A U.L.J., surtout

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	7
METHODES	11
Milieux d'incubation	11
Dosages	13
Mouvements de ^{45}Ca (ou ^{89}Sr)	13
Calculs statistiques	15
RESULTATS	17
Influence du sodium sur l'influx de calcium lors de la dépolarisation membranaire	17
Influence du milieu ionique sur l'efflux de calcium	27
Effet de substances qui réduisent la perméabilité calcique	41
Strontium, substitut du calcium	52
Sécrétion des hormones neurohypophysaires par exocytose	59

DISCUSSION	66
Théorie calcique du couplage dépolarisation-sécrétion	66
Sécrétion des hormones neuro- hypophysaires par exocytose	71
Rôles possibles du calcium dans le processus d'exocytose	75
Mécanismes qui assurent le main- tien à long terme de la concen- tration cytoplasmique de calcium ionisé	78
Conclusion	81
RESUME	84
BIBLIOGRAPHIE	86
APPENDICE	95



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545929_0050

INTRODUCTION

Dans de nombreux tissus sécréteurs, le calcium joue un rôle primordial dans la séquence des événements qui aboutissent à la libération de la sécrétion (*) (MATTHEWS, 1970, RUBIN, 1970, SMITH, 1971).

Des progrès décisifs dans la connaissance des processus de sécrétion ont suivi l'application à la jonction neuro-musculaire des techniques d'enregistrement intracellulaire de l'activité bio-électrique consécutive à la libération d'acétylcholine (KATZ, 1966, 1969).

Ces études sur la jonction neuro-musculaire ont démontré que la sécrétion du médiateur en réponse à la dépolarisation membranaire est un processus qui nécessite la présence de Ca dans le milieu externe et qui aboutit à la sécrétion de paquets multi-moléculaires ("quanta") d'acétylcholine dont le substrat anatomique est probablement constitué par les vésicules synaptiques. Une sécrétion quantique et la présence d'organites subcellulaires visibles au microscope électronique sont la règle pour les neurones, quelle que soit la nature du médiateur chimique qui est utilisé dans la communication intercellulaire (HUBBARD, 1970). L'étude d'autres cellules excrétrices où

(*) D'après le Dictionnaire français de Médecine et de Biologie, la sécrétion est définie comme étant "la fonction remplie par des cellules spécialisées qui élaborent des produits qu'elles excrètent". Dans ce travail, le mot sécrétion est utilisé dans le sens restreint de "processus d'excrétion" d'une substance élaborée par des cellules et qui agit après expulsion dans le milieu extracellulaire. Nous utilisons les synonymes suivants: libération, excrétion.

le produit de sécrétion est aussi stocké dans des organites subcellulaires bordés d'une membrane unitaire indiquant que la dépendance du processus de sécrétion de la présence de Ca dans le milieu extracellulaire est apparemment universelle.

Les produits de sécrétion de la neurohypophyse, l'ocytocine et la vasopressine, sont également emmagasinés dans des organites subcellulaires de stockage, les granules de neurosécrétion. Les hormones neurohypophysaires sont synthétisées dans les péricarya de neurones supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus et stockées dans les granules; ceux-ci sont ensuite véhiculés par flux axoplasmique jusqu'aux terminaisons neurosécrétrices localisées dans la neurohypophyse, d'où les hormones peuvent être libérées dans la circulation sanguine (BARGMANN et SCHARER, 1951).

Les facteurs humoraux et nerveux qui règlent la sécrétion des hormones neurohypophysaires en fonction des besoins de l'organisme agissent sur la membrane du péricaryon des neurones supraoptiques et paraventriculaires. Ces facteurs n'ont vraisemblablement pas d'action directe sur les terminaisons neurosécrétrices situées dans la neurohypophyse (NORDMANN et al., 1971), mais agissent sur celles-ci par l'intermédiaire de potentiels d'action propagés.

Une modification de la fréquence de décharge de ces potentiels d'action s'observe lors de l'injection intracarotidienne de solutions hypertoniques ou d'acétylcholine (CROSS et GREEN, 1959), lors de la distension utérine ou de la stimulation des mamelons (BROOKS et al., 1966) et en réponse à certaines stimulations électriques de fibres afférentes vagues (BARKER et al., 1971), situations expérimentales qui s'accompagnent d'une augmentation de la sécrétion des hormones neurohypophysaires.

Les processus cellulaires qui suivent la dépolarisation des terminaisons neurosécrétrices et qui aboutissent à la libération des hormones dans les capillaires ("couplage dépolarisation-sécrétion") se prêtent mal à des investigations in situ. La dépendance ionique des sécrétions cellulaires ne peut être étudiée que sur des tissus maintenus en survie in vitro, dans une situation où il est possible de modifier la composition de la solution d'incubation. Aussi, la plupart des données sur le couplage dépolarisation-sécrétion ont-elles été obtenues sur la neurohypophyse isolée (DOUGLAS, 1963). Prélevée sur un animal décapité, incubée dans un milieu salin oxygéné et maintenu à un pH physiologique, la neurohypophyse peut survivre au moins une demi-journée in vitro en conservant la capacité de répondre à des stimuli par une sécrétion hormonale accrue.

Une dépolarisation consécutive à une élévation de la concentration de potassium du milieu d'incubation provoque, en présence de calcium externe, une libération de vasopressine supérieure à la sécrétion basale (*) (DOUGLAS et POISNER, 1964a). DICKER (1966) et ISHIDA (1968) ont montré que la sécrétion d'ocytocine dépend similairement du calcium externe. La quantité d'hormone sécrétée s'élève progressivement jusqu'à environ 4 mM de CaCl_2 ; à des concentrations plus élevées, elle est inhibée, probablement par une action non spécifique de fortes concentrations de cations divalents sur la perméabilité membranaire. Le strontium (BUCHS et al., 1972) et le barium (HALLER et al., 1965 ; ISHIDA, 1968) peuvent

(*) Nous appelons sécrétion basale la sécrétion hormonale qui a lieu en l'absence d'intervention extérieure.

remplacer le calcium dans le couplage dépolarisation-sécrétion, mais les autres cations sont de médiocres substituts. La sécrétion hormonale est fortement réduite en présence de 10 - 20 mM de magnésium externe.

L'effet stimulant d'une élévation de la concentration extracellulaire de KCl sur la sécrétion hormonale in vitro n'est pas dû à une action en soi du potassium ou du chlore mais est secondaire à la réduction du potentiel de membrane des terminaisons neurosécrétrices. La libération hormonale ne nécessite pas la présence de chlore et de sodium dans le milieu extracellulaire.

La stimulation électrique de neurohypophyses isolées en milieu ionique non dépolarisant favorise aussi la sécrétion; celle-ci dépend, comme la sécrétion en réponse à la stimulation potassique, de la concentration de Ca et de Mg (MIKITEN et DOUGLAS, 1965).

DOUGLAS et POISNER (1964b) ont montré qu'au cours de conditions expérimentales qui stimulent la sécrétion hormonale à partir de la neurohypophyse isolée une augmentation de la perméabilité membranaire au calcium s'observe.

Dans ce travail, le rôle du calcium (et du strontium) dans les processus qui aboutissent à la sécrétion des hormones neurohypophysaires a été réétudié, en utilisant à cette fin les isotopes ^{45}Ca et ^{89}Sr .

METHODES

Toutes les expériences ont été faites sur des neurohypophyses isolées, incubées in vitro. Les glandes ont été prélevées sur des rats mâles de 230 - 280 g. L'animal est décapité au moyen d'une guillotine; après craniotomie, les os pariétaux sont réclinés et le cerveau est enlevé à l'exception de l'hypophyse qui reste fixée à l'os sphénoïde. Après incision de la dure-mère, la neurohypophyse est séparée du lobe antérieur sous le contrôle d'une loupe à dissection et placée dans une solution de Locke maintenue à 37°C et parcourue par un courant gazeux composé de 95% O₂ et de 5% CO₂.

Milieux d'incubation

La composition de la solution est la suivante (mM) : NaCl, 150; KCl, 5,6; CaCl₂, 2,2; MgCl₂, 1,0; NaHCO₃, 6,0; glucose, 10. Le pH de la solution est de 7,3±0,1.

Pour provoquer une libération hormonale accrue, la concentration de KCl est portée à 56 mM pour une période de 10 minutes (Locke-K). Dans la plupart des expériences, une fraction ou la totalité du NaCl de la solution ont été remplacées par des quantités équimolaires de chlorure de choline (C₅H₁₄ClNO), et le NaHCO₃ par du KHCO₃ (solution "Locke-choline"). Dans la solution de "Locke-choline-K", la concentration de KCl est de 56 mM et la concentration de chlorure de choline diminuée en proportion.

La composition des solutions principales est indiquée dans le tableau I; les autres modifications de leur composition seront indiquées dans le texte.

Tableau I

Composition des solutions principales, en mM

	Dénomination de la solution		
	Locke	Locke-choline	Locke-choline -K
NaCl	150	-	-
$C_5H_{14}ClNO$	-	150	100
KCl	5,6	5,6	56
$NaHCO_3$	6	-	-
$KHCO_3$	-	6	6
$CaCl_2$	2,2	2,2	2,2
$MgCl_2$	1	1	1
glucose	10	10	10

Dans les expériences où du $LaCl_3$ est utilisé, 5 mM de Tris (Tris-(hydroxyméthyl)-amino-méthane) remplacent le bicarbonate.

Les produits inorganiques utilisés ont été obtenus auprès des maisons suivantes : Merck et Fluka; à l'exception de : $LiCl_2$, Fisher Scientific Company; D_{600} , Knoll A.G.; Tetrodotoxine, Sankyo. Les produits radioactifs,

^{45}Ca et ^{89}Sr ont été fournis par Radiochemical Centre Amersham.

Dosages

L'ocytocine et la vasopressine libérées dans le milieu d'incubation ont été dosées à l'aide d'un test biologique: la pression d'éjection du lait chez la rate allaitante (BISSET et al., 1967). Le principe de la méthode consiste à comparer l'augmentation de la pression intramammaire consécutive à l'injection intraveineuse d'une solution contenant une quantité inconnue d'hormone avec les variations de pression observées après injection d'une concentration standard d'ocytocine.

Les neurohypophysines ont été dosées à l'aide d'un test radioimmunologique, par J.J. Legros. Des anticorps anti-neurophysine bovine sont mises en présence d'une quantité inconnue de neurophysine de rat et la quantité de neurophysine fixée déterminée (LEGROS et al., 1969).

Mouvements de ^{45}Ca (ou ^{89}Sr)

Influx

Immédiatement après son prélèvement, une neurohypophyse est placée pendant 30 min dans la solution de Locke, puis pendant 15 min dans du Locke contenant $10\ \mu\text{Ci/ml}$ de ^{45}Ca (ou de ^{89}Sr). L'activité spécifique du ^{45}Ca et du ^{89}Sr étant d'environ $2,2 \times 10^5\ \mu\text{Ci/mM}$, leur adjonction ne change pas de manière significative la concentration de

l'ion considéré. Quand l'effet du changement de la composition ionique du milieu ou l'effet de diverses substances sont testés, la préparation est incubée dans la solution modifiée pendant 35 min au total, soit pendant les 15 min d'exposition au ^{45}Ca (ou au ^{89}Sr) et pendant les 20 min qui la précèdent. Lorsque la préparation est stimulée par dépolarisation, l'adjonction de KCl se fait pendant les 10 dernières minutes d'exposition à l'ion radioactif. Après l'exposition à la solution radioactive, la glande est immergée dans la solution de Locke non radioactive, que l'on renouvelle toutes les 10 min pendant 60 min dans le but de laver l'espace extracellulaire. Un temps de 60 min surestime probablement le temps nécessaire pour échanger complètement l'espace extracellulaire. Après cette période, le contenu résiduel en radioactivité de la neurohypophyse est déterminé.

Efflux

Les expériences d'efflux ont été effectuées sur des groupes de 4 neurohypophyses incubées ensemble. Pour les charger en calcium radioactif, les glandes sont placées pendant 60 min dans une solution de Locke-choline-K (tableau I) contenant $33 \mu\text{Ci/ml}$ de ^{45}Ca . Puis les préparations sont incubées dans une solution non radioactive qu'on renouvelle toutes les 10 min. La radioactivité apparaissant dans chaque incubat est déterminée. A la fin de l'expérience, le contenu résiduel des glandes en ^{45}Ca est mesuré. Connaissant la quantité d'ions radioactifs perdus par les glandes pour chaque dizaine de minutes d'efflux et connaissant, d'autre part, le contenu

en ^{45}Ca des glandes à ce moment, on détermine l'efflux fractionnaire de Ca, soit le rapport :

coups apparaissant dans le milieu/durée de collection
contenu moyen en coups dans les glandes durant cette période

Mesures de la radioactivité

1 ml de solution de lavage contenant le ^{45}Ca perdu par la glande en 10 min est mélangé à 5 ml de la solution scintillante (BRAY, 1960). La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (Tricarb 3003 Packard) dont le bruit de fond d'environ 10 coups/min (cpm) a été soustrait des valeurs obtenues.

Pour déterminer le ^{45}Ca restant dans la neurohypophyse à la fin de la période de lavage la neurohypophyse est broyée dans 1 ml de HClO_4 (0.11% poids/volume). Après centrifugation, le surnageant est mélangé à 5 ml de solution scintillante.

L'activité spécifique des solutions a été mesurée chaque fois afin de pouvoir comparer les résultats d'expériences différentes.

Calculs statistiques

Les résultats sont exprimés par la moyenne ($\bar{x}$) $\pm$ 1 écart standard (E.S.)

$$E.S. = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{(n-1) n}}$$

n = nombre d'expériences

x_i = valeurs individuelles

$\bar{x}$ = moyenne arithmétique

La comparaison de deux groupes de résultats a été faite à l'aide du test de Student.

Dans certains cas, une valeur a été exclue d'un groupe si elle diffère par trop du reste du groupe (test de la moyenne, DIXON, 1951).

RESULTATS

Influence du sodium sur l'influx de calcium lors de la dépoléarisation membranaire

Dans l'organisme intact et après stimulation électrique de la neurohypophyse in vitro la libération des hormones neurohypophysaires est déclenchée par des potentiels d'action qui envahissent les terminaisons neurosécrétries. Alors que ces potentiels d'action dépendent de l'existence d'un gradient transmembranaire de sodium, les phénomènes qui suivent la dépoléarisation membranaire sont de nature calcique. Ainsi, une dépoléarisation membranaire ne provoque une sécrétion des hormones neurohypophysaire qu'en présence de Ca externe et la libération hormonale s'accompagne d'un influx de ^{45}Ca dans les cellules (DOUGLAS et POISNER, 1964b). Ces processus ont aussi lieu en l'absence de Na externe; en fait, une diminution de la concentration de Na de la solution d'incubation, loin de réduire, potentialise la sécrétion hormonale provoquée par une élévation de la concentration de KCl (Fig.1). Dans une certaine étendue de concentration de Ca, la sécrétion hormonale est fonction du rapport $\frac{\text{Ca}}{\text{Na}^2}$ (DREIFUSS et al., 1971, GRAU, 1973). Il convient de noter que d'autres processus biologiques qui dépendent de l'entrée de Ca dans les cellules (contraction de la musculature cardiaque, WILBRANDT et KOLLER, 1948; sécrétion d'acétylcholine par les terminaisons nerveuses motrices, KELLY, 1965) dépendent aussi de ce même rapport de concentration.

Il a été postulé que la sécrétion des hormones neurohypophysaires dépend de l'augmentation de la concentration de Ca ionisé consécutive à l'entrée de Ca dans les terminaisons dépolarisées. DOUGLAS et POISNER (1964b) ont montré que la sécrétion hormonale s'accompagne d'un gain de ^{45}Ca par les neurohypophyses stimulées, par rapport à des glandes témoins; ce gain est proportionnel dans la règle aux quantités d'hormone sécrétées. Ces auteurs n'ont toutefois pas décelé de différence dans la captation de ^{45}Ca lorsque leurs expériences étaient effectuées en présence ou en l'absence de Na externe, alors qu'ils ont observé que la sécrétion de vasopressine est fortement accrue lorsque des neurohypophyses sont dépolarisées en l'absence de Na externe.

En raison de la divergence de ces résultats et de la théorie calcique du couplage dépolarisation-sécrétion, nous avons examiné si la concentration de Na externe modifie l'entrée de Ca dans les cellules de la neurohypophyse dans nos conditions expérimentales.

Des glandes ont été stimulées par une élévation de la concentration de KCl à 56 mM en présence de 0 - 50 - ou de 100 mM de Na, l'osmolarité de la solution d'incubation étant maintenue à 320 mOsm par des quantités appropriées de choline. Un autre groupe de neurohypophyses a baigné dans des milieux de différente teneur en Na en présence de 5,6 mM de KCl et a servi de témoin.

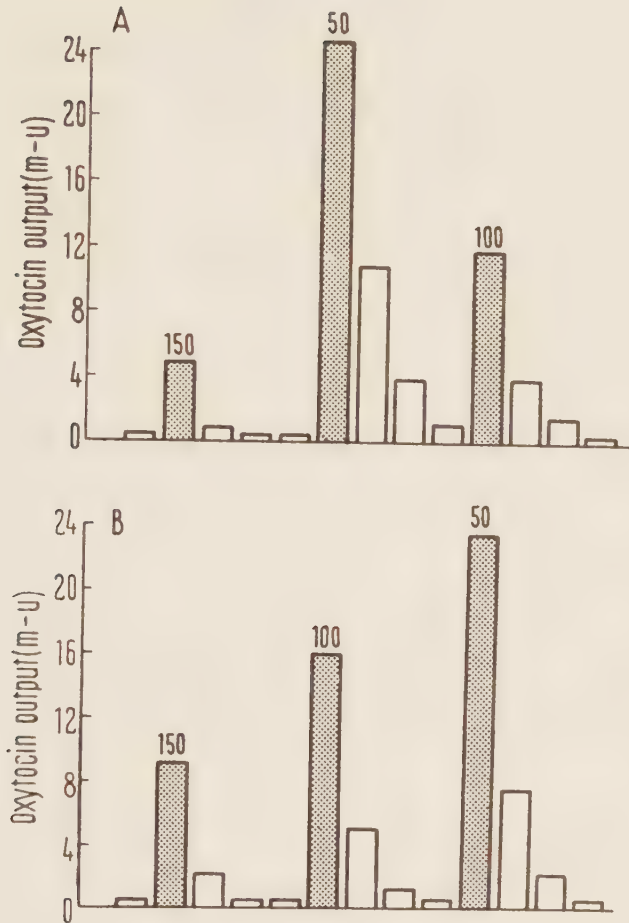


Fig.1. Effet de la substitution partielle de la choline au sodium sur la libération d'hormones provoquée par dépolarisation membranaire. Chaque colonne représente la quantité d'hormone libérée par une neurohypophyse pendant des périodes d'incubation successives de 10 min. A et B illustrent les résultats de 2 expériences, chacune effectuée sur une neurohypophyse incubée pendant 13 x 10 min. Colonnes blanches : incubation dans la solution de Locke; colonnes grises : incubation dans une solution contenant 56 mM de KCl. La concentration de sodium est indiquée au sommet des colonnes (D'après DREIFUSS et al., 1971).

La dépolarisation membranaire, qui provoque une augmentation de la sécrétion hormonale, s'accompagne aussi d'une augmentation de la captation de ^{45}Ca par les neurohypophyses (tableau II, Fig.2 A). La différence selon que le milieu dépolarisant contient ou non du Na est, elle aussi, significative ($p < 0.01$). La Fig.2 B illustre que l'influx supplémentaire de ^{45}Ca (c'est-à-dire la différence entre l'influx en présence de 5,6 et de 56 mM de KCl) est aussi fonction de la concentration externe de Na.

Ces résultats montrent que le contenu résiduel en ^{45}Ca des glandes est d'autant élevé qu'était plus basse, au moment de la dépolarisation, la concentration externe de Na. Cette tendance ne s'est pas seulement manifestée lorsque la durée pendant laquelle la concentration de KCl a été élevée à 56 mM a été de 10 min, mais aussi, comme l'indique la Fig.3, pour des durées plus courtes et plus longues. Dans cette expérience des groupes de neurohypophyses ont été dépolarisées pendant 1,5 - 5 - 10 et 20 minutes en présence ou en l'absence de Na externe.

Ces résultats sont en contradiction avec ceux de DOUGLAS et POISNER (1964b) qui avaient conclu que la concentration de Na externe n'affectait pas la captation de Ca radioactif causée par la dépolarisation des terminaisons neurosécrétrices. Seuls diffèrent, entre leurs expériences et les nôtres, l'agent maintenant l'osmolarité en l'absence du Na externe (saccharose et choline) et la solution utilisée pour le lavage de l'espace extracellulaire (Locke et Locke-choline). Nous avons tenté de déterminer lequel de ces deux paramètres explique la différence.

Tableau II

Captation de ^{45}Ca en fonction des concentrations extracellulaires de K et de Na.

Solution	coups/min	E.S.	n	p
0 Na 5,6 K	178	10	7	} < 0.001
0 Na 56,0 K	373	32	7	
50 Na 5,6 K	124	5	7	} < 0.001
50 Na 56,0 K	260	7	7	
100 Na 5,6 K	159	7	7	} < 0.001
100 Na 56,0 K	258	21	7	

n = nombre d'expériences

Osmolarité maintenue par du chloture de choline

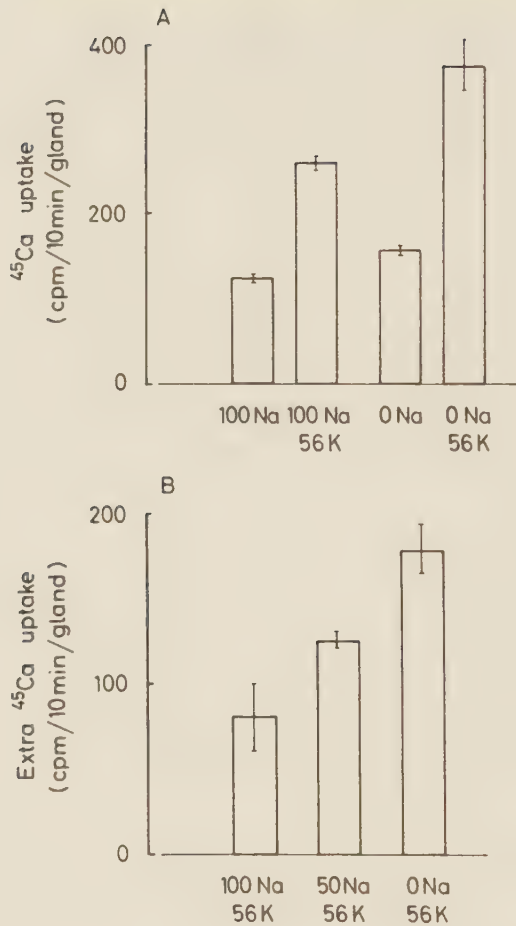


Fig.2. Influx de calcium dans des neurohypophyses dépolarisées ou témoins en fonction de la concentration externe de sodium. Les colonnes représentent l'influx moyen de ^{45}Ca ($\pm$ ES, n=7) après 10 min d'incubation dans des solutions contenant 100, 50 ou 0 mM de Na en présence de 5,6 ou de 56 mM de potassium. L'osmolarité a été maintenue avec du chlorure de choline. A) Influx dans des neurohypophyses dépolarisées ou non dépolarisées, en présence et en l'absence de Na externe. L'influx en présence de 56 mM de KCl est approximativement deux fois plus élevé qu'en présence de 5,6 mM de KCl. B) Excès de radioactivité trouvé dans les glandes dépolarisées (en comparaison avec les témoins non dépolarisés) en présence de 3 concentrations différentes de Na externe.

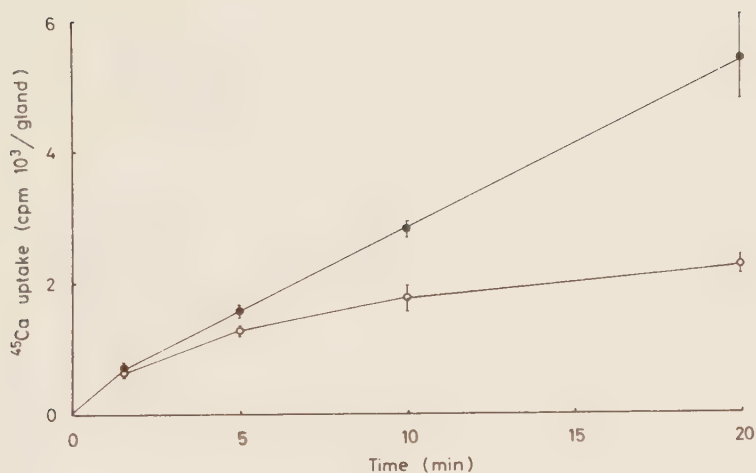


Fig.3. ^{45}Ca résiduel dans des neurohypophyses après dépolarisations de durées variables, en présence et en l'absence de sodium externe. Radioactivité moyenne ($\pm$ ES, $n=6$) dans les glandes incubées pendant 1,5 - 5 - 10 et 20 min dans une solution dépolarisante contenant 100 mM (○) ou 0 mM (●) de sodium.

A) Dans le but de comparer les substituants du Na, nous avons stimulé des neurohypophyses par du potassium dans un milieu contenant 100 ou 0 mM de Na, l'osmolarité des solutions étant maintenue soit par du saccharose, soit par du chlorure de choline. Les résultats sont illustrés dans la Fig.4 et montrent que la différence de captation de ^{45}Ca observée en présence de choline n'a pas été retrouvée en présence de saccharose. Nous pensons que le saccharose représente un moins bon substitut pour le sodium que la choline, peut-être parce que le saccharose ne compense pas la perte de force ionique de la solution.

B) Afin de déterminer quel pouvait être le rôle de la solution de lavage, un groupe de neurohypophyses a été stimulé dans une solution contenant 100 mM de Na, un second groupe dans un milieu ne contenant pas de Na, mais une concentration de saccharose suffisante pour maintenir l'osmolarité de la solution. Chaque groupe a été subdivisé en deux, un sous-groupe étant lavé dans la solution de Locke, l'autre dans une solution de Locke-choline. La Fig.5 illustre à nouveau l'absence de différence selon que la solution dépolarisante contient ou non du Na; en revanche, on observe une différence significative ($p < 0,001$) entre les glandes, selon qu'elles sont lavées dans un milieu contenant ou non du Na. Cette observation suggère un rôle supplémentaire du gradient transmembranaire de Na sur les mouvements de Ca et sur les quantités de ^{45}Ca qui sont retenues dans les neurohypophyses. Comme la quantité de ^{45}Ca qu'on retrouve dans les cellules après lavage est le résultat de la différence entre l'influx et l'efflux, cette observation nous a amenés à étudier le rôle de la concentration externe de Na sur l'efflux de ^{45}Ca .

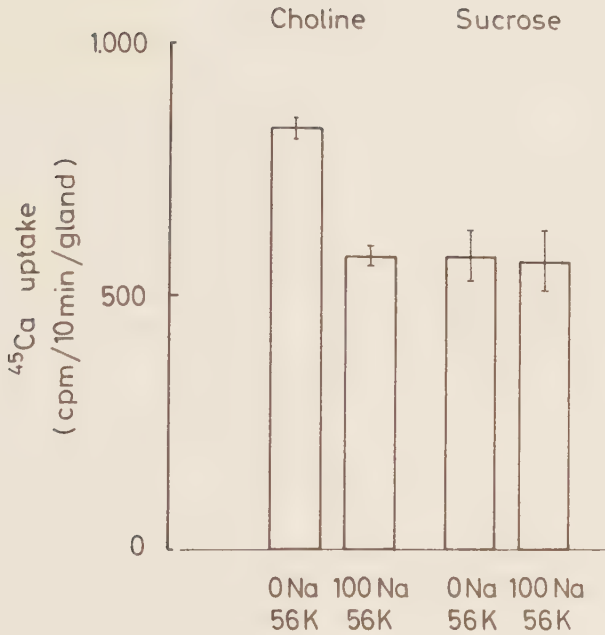


Fig.4. Effets de deux substituants du sodium sur l'influx de ^{45}Ca après dépolarisation membranaire de 10 min. Les colonnes représentent la radioactivité moyenne ($\pm$ ES, $n=6$) trouvée après 60 min de lavage dans la solution de Locke-choline dans les neurohypophyses dépolarisées en présence de 100 (2^e et 4^e colonnes) ou de 0 mM de Na. L'osmolarité est maintenue par du chlorure de choline (1^e colonne) ou par du saccharose (3^e colonne).

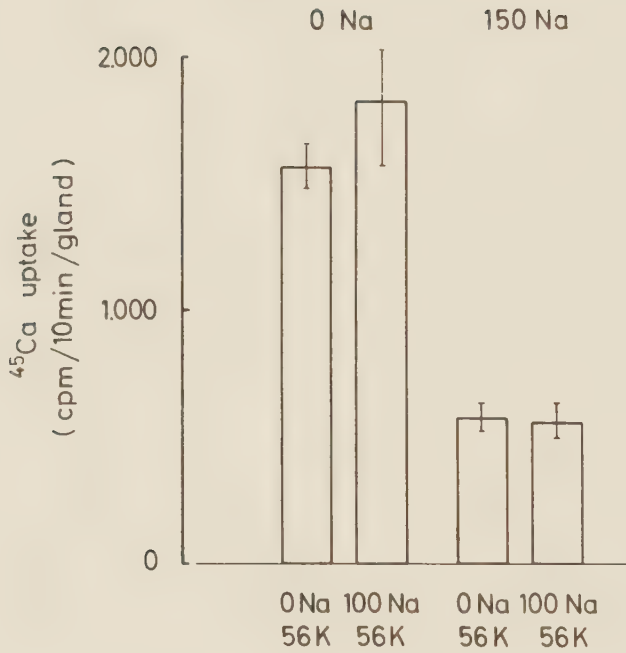


Fig.5. Effets de la teneur en sodium du milieu de lavage sur l'influx de ^{45}Ca après dépolarisation membranaire de 10 min. Les colonnes représentent la radioactivité moyenne ($\pm$ ES, n=6) trouvée dans des neurohypophyses dépolarisées en présence de 100 (2^e et 4^e colonnes) ou de 0 mM de Na (1^e et 3^e colonnes, substitution par le saccharose). Les glandes ont été lavées pendant 60 min dans une solution de Locke-choline (1^e et 2^e colonnes) ou de Locke (3^e et 4^e colonnes).

Influence du milieu ionique sur l'efflux de calcium

Nous avons montré que la sécrétion des hormones neurohypophysaires en réponse à une dépolarisation membranaire s'accompagne d'une captation accrue de ^{45}Ca par les neurohypophyses. L'entrée de Ca dans les cellules peut se faire par simple diffusion puisqu'il y a vraisemblablement, par analogie avec d'autres cellules, au moins 10^4 fois plus de Ca ionisé extra- qu'intracellulaire. La sécrétion hormonale dépend du maintien de ce gradient. Peu de données sont disponibles pour le moment sur les mécanismes qui maintiennent le Ca ionisé interne à une concentration très basse. Dans la plupart des tissus excitables, la concentration cytoplasmique de Ca ionisé est nettement plus faible que celle qui est nécessaire pour maintenir le calcium en équilibre thermodynamique (HODGKIN et KEYNES, 1957). Ces considérations obligent à imaginer l'existence dans ces cellules d'un processus qui assure l'extrusion de Ca contre un gradient électrochimique.

Dans nombre de cellules non excitables (BORLE, 1968b; SCHATZMANN et VICENZI, 1969. LAMB et al., 1971), on a décrit un processus actif d'extrusion du Ca qui s'accompagne d'une diminution de la concentration d'ATP. A l'opposé, dans plusieurs types de cellules excitables, il existe apparemment un mécanisme d'expulsion du Ca dont l'énergie d'activation est faible et qui dépend de l'existence d'un gradient électrochimique pour le Na (REUTER et SEITZ, 1968, BAKER, 1972); on a postulé qu'un ion calcium est éjecté dans le milieu externe par un mécanisme de contre-transport chaque fois que 2-3 ions Na diffusent dans la cellule (BLAUSTEIN et HODGKIN, 1969).

Pour déterminer si ce mécanisme intervient aussi dans notre préparation, nous avons étudié l'efflux de Ca à partir de neurohypophyses préalablement chargées en ^{45}Ca . La Fig.6 A, illustre le décours de la diminution de l'activité de ^{45}Ca de neurohypophyses incubées dans une solution de Locke; les glandes y perdent progressivement du ^{45}Ca . Lorsque les données sont exprimées en tant que fraction de ^{45}Ca perdue dans le milieu par minute (Fig.6 B) on note au cours du temps une diminution

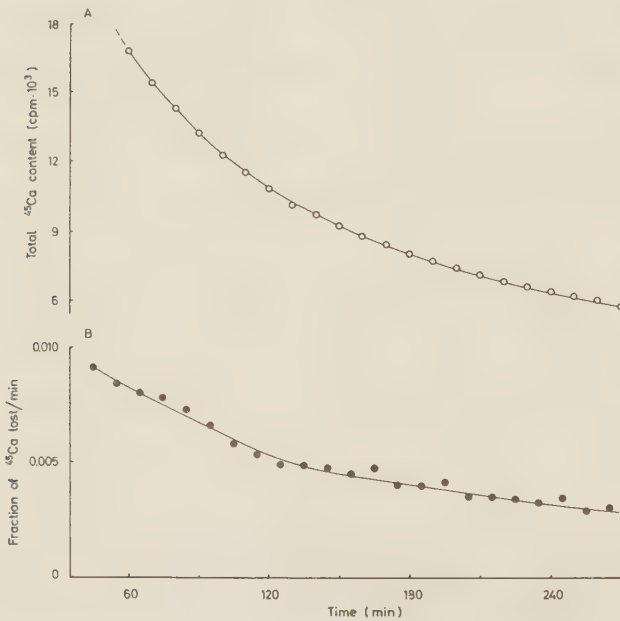


Fig.6. Efflux de calcium à partir d'un groupe de quatre neurohypophyses incubées dans une solution de Locke. A, diminution du contenu en ^{45}Ca des glandes au cours du lavage. B, fraction de ^{45}Ca perdue par min par glande au cours du lavage. Abscisse: temps (min) à partir du transfert de la préparation dans une solution de Locke contenant du ^{40}Ca .

d'abord rapide, puis plus lente de cette fraction. Toutes les modifications de la composition de la solution de lavage ont été faites après une période initiale de lavage de deux heures.

1. Effet de la concentration de Na externe

Lorsqu'après 2 heures de lavage dans un milieu de Locke, tout le Na externe est remplacé équimolairement par de la choline, on observe une diminution de l'efflux fractionnaire de ^{45}Ca qui se stabilise, vingt minutes après le changement de milieu, à une valeur inférieure de moitié environ à celle observée en présence de Na; cet effet est réversible par réintroduction du Na (Fig.7 A). Lorsque le lavage initial est effectué dans une solution de Locke-choline (sans Na), l'efflux fractionnaire de ^{45}Ca est significativement plus bas qu'en présence de Na externe, mais augmente fortement si la choline est remplacée par du Na (Fig.7 B). Sur une série d'expériences de ce type, la fraction Na-dépendante de l'efflux total de ^{45}Ca a été de $43 \pm 3\%$ (n=8) en présence de 2,2 mM de Ca externe et de $47 \pm 4\%$ (n=4) en l'absence de Ca externe. Dans nos conditions expérimentales la fraction Na-dépendante de l'efflux de ^{45}Ca varie approximativement linéairement avec la concentration externe de Na (Fig.8).

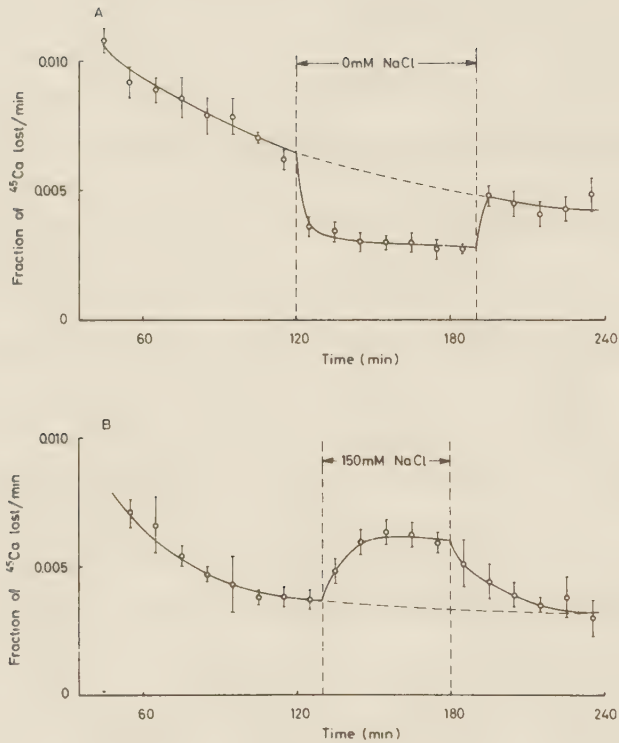


Fig.7. Efflux de ^{45}Ca à partir de neurohypophyses en présence et en l'absence de Na externe. Chaque point représente l'efflux fractionnaire moyen ($\pm$ ES, $n=8$). A, après 120 min de lavage dans la solution de Locke, tout le Na a été remplacé par 150 mM de choline; à 190 min, retour des préparations dans la solution de Locke. B, après 130 min de lavage en solution de Locke-choline, on a substitué iso-osmotiquement le Na à la choline pendant la durée indiquée en abscisse.

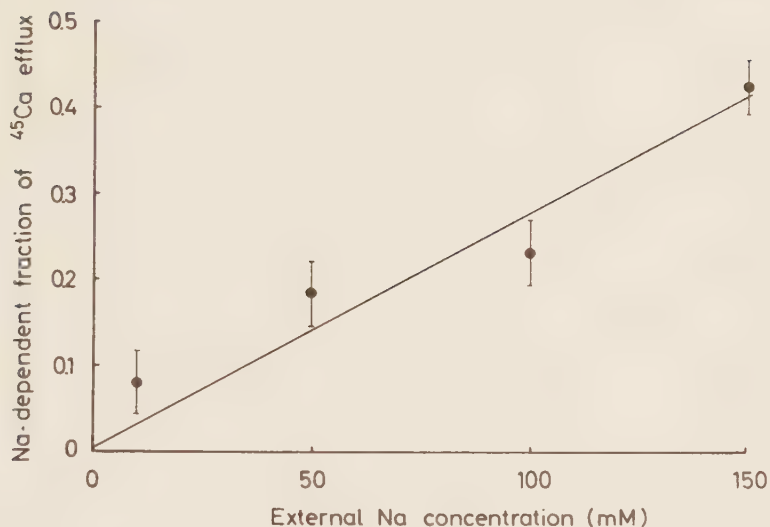
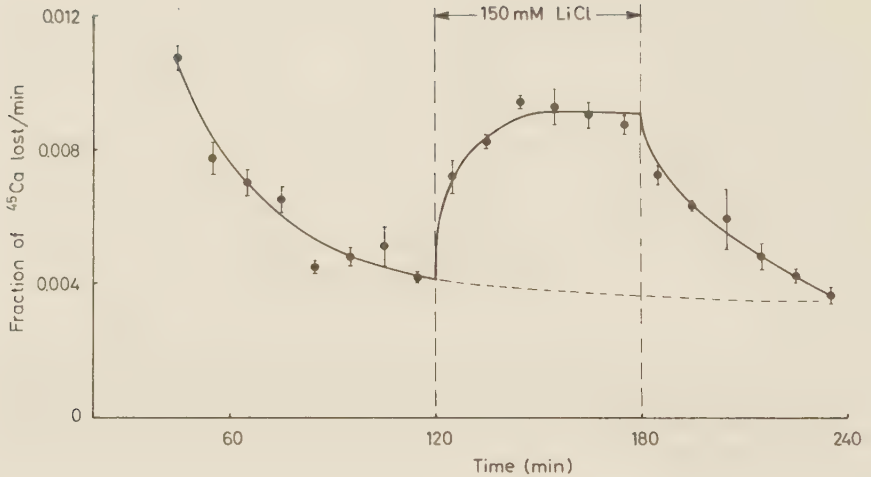


Fig.8. Dépendance de l'efflux de ^{45}Ca de la concentration externe de Na. La fraction Na-dépendante de l'efflux calcique est portée en ordonnée et la concentration de Na en abscisse.

Au cours d'une expérience où le lavage a été effectué dans une solution de Locke-choline, la substitution de Li à la choline a provoqué une augmentation de l'efflux fractionnaire de ^{45}Ca d'amplitude comparable à celle obtenue en présence d'une concentration équimolaire de Na (Fig.9).



Ces résultats indiquent que l'efflux de ^{45}Ca à partir de neurohypophyses dépend du gradient chimique transmembranaire de cations monovalents diffusibles. Des résultats similaires ont été décrits dans d'autres préparations neuronales; axone géant du calmar (BAKER, 1970), nerf vague du lapin (KALIX, 1971) et synaptosomes (BLAUSTEIN et WIESMANN, 1970; STAHL et SWANSON, 1972).

S'il existe un contre-transport de Ca en échange d'ions Na entrant par diffusion dans les cellules,

l'équation (1) décrit la concentration maximum de Ca ionisé interne (cf. BLAUSTEIN et HODGKIN, 1969) :

$$[Ca]_i = \frac{[Na]_i^n}{[Na]_e^n} [Ca]_e \quad (1)$$

suffixe i=milieu interne suffixe e=milieu externe
où n représente le nombre de molécules de Na qui s'échangent contre un Ca. Pour n=2, l'échange ne s'accompagne pas d'un transfert net de charge; pour n>2, soit le système est électrogène, soit l'excès de Na entrant doit être contrebalancé par un nombre approprié de cations sortants ou d'anions entrants.

Dans la neurohypophyse, les concentrations ioniques internes ne sont pas connues avec précision et sont probablement rapidement modifiées par un changement des concentrations ioniques externes en raison du faible diamètre des axones. Une élévation du sodium externe entraîne ainsi vraisemblablement une élévation de la concentration du Na interne. La linéarité apparente de la relation entre la concentration de Na externe et l'efflux fractionnaire de Ca pourrait résulter d'une augmentation du Na interne en rapport avec les modifications de la concentration externe de Na.

L'efflux de Ca dans la neurohypophyse dépend, en fin de compte, du maintien du gradient transmembranaire de Na, donc du fonctionnement de la "pompe à sodium" à laquelle l'ATP fournit son énergie (SKOU, 1971)

Dans le but de déterminer un rôle éventuel du métabolisme oxydatif dans l'efflux de Ca, nous avons étudié l'effet sur l'efflux fractionnaire de ^{45}Ca d'un abaissement de la température ou d'inhibiteurs métaboliques.

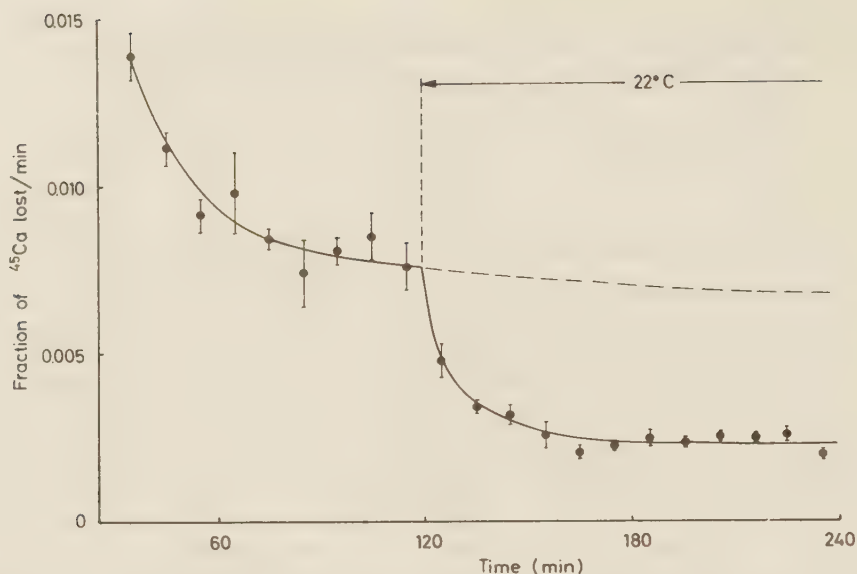


Fig.10. Effet de la température sur l'efflux de ^{45}Ca . Chaque point représente l'efflux fractionnaire moyen ($\pm$ ES, $n=4$). Après deux heures de lavage à 35°C , la température de la solution de Locke a été abaissée à 22°C .

2. Effet d'une diminution de la température

La Fig.10 illustre une expérience typique du schéma expérimental utilisé dans cette étude. Après 120 min de lavage en Locke à 35°C , 4 groupes de 4 neurohypophyses ont été incubées dans une solution identique mais à 22°C . On note une forte diminution de l'efflux fractionnaire, qui se "stabilise" à 37% de ce qu'il aurait été si l'expérience avait été poursuivie à 35°C (le décours à température constante est représenté en pointillé). Une expérience similaire a été effectuée en abaissant la tem-

pérature de 35°C à 27°C; l'efflux fractionnaire est tombé dans ce cas à 63% de celui du témoin.

Une droite est obtenue lorsque le logarithme de l'efflux fractionnaire de ^{45}Ca est porté en ordonnée et l'inverse de la température absolue en abscisse (Fig. 11 A); l'énergie d'activation calculée correspond à environ 12'000 cal/mole et le Q_{10} à environ 2,0. L'énergie d'activation A est obtenue à partir de l'équation d'Arrhenius

$$\ln K = -\frac{A}{RT} + C \quad (2)$$

où K = efflux fractionnaire

R = constante des gaz

T = température absolue

C = constante

L'énergie d'activation peut être calculée à partir de la pente de la droite

$$-A = \frac{d \ln K}{d(1/T)} \quad (3)$$

Ces valeurs permettent d'estimer la dépendance thermique de l'efflux calcique total. Pour estimer celle de la fraction Na-dépendante de l'efflux, des expériences semblables à celles décrites ci-dessus ont été effectuées dans des milieux de Locke-choline (sans Na) et les résultats portés sur un graphique selon l'équation d'Arrhenius (Fig. 11 B). On constate que l'énergie d'activation (environ 4'000 cal/mole) et le Q_{10} (environ 1,25) sont plus bas que ceux déterminés en présence de Na. Une énergie d'activation de 6'800 cal/mole et un Q_{10} d'environ 1,45 ont été trouvés à partir des résultats d'expé-

riences dans lesquelles le milieu d'incubation contenait 150 mM de Na et était dépourvu de Ca. Ces valeurs donnent à penser qu'une partie au moins de l'efflux indépendant du Na et du Ca externe représente une désorption de Ca fixé extracellulairement.

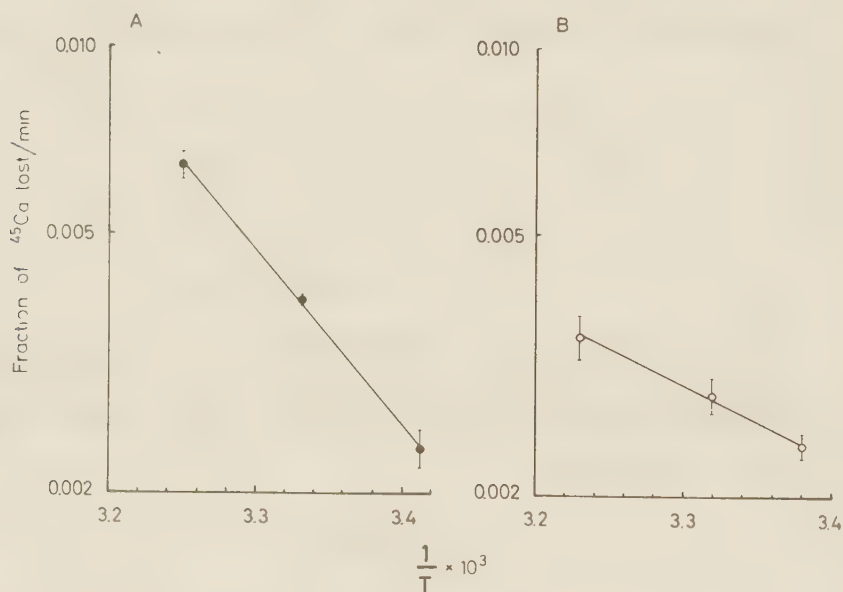


Fig.11. Effet de la température sur l'efflux de ^{45}Ca . L'efflux fractionnaire moyen ($\pm$ ES, n=4, ordonnée) à partir de neurohypophyses incubées dans la solution de Locke (A) ou dans la solution de Locke-choline (B) est porté en fonction de l'inverse de la température absolue (abscisse).

3. Effet d'inhibiteurs métaboliques

Nous avons étudié l'effet sur l'efflux de Ca d'inhibiteurs de la respiration (acide iodoacétique), de découpleurs (dinitrophénol, cyanure) et d'agents qui sont des inhibiteurs de la Mg-ATPase et des réducteurs des ponts disulfures (N-éthyl-maléimide, acide éthacrynique). On observe une augmentation de l'efflux de ^{45}Ca en présence de toutes ces substances, illustrée pour le cyanure (Fig.12), le dinitrophénol (Fig.12), l'acide iodoacétique

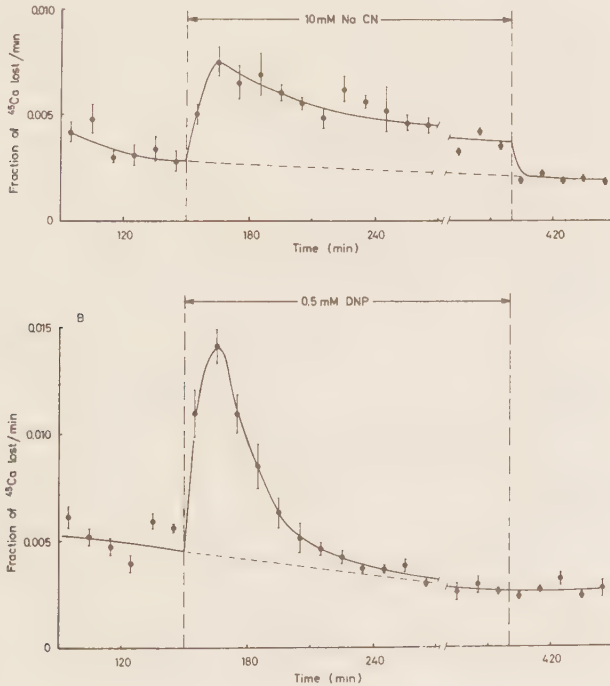


Fig.12. Effet du cyanure (A) et du dinitrophénol (B) sur l'efflux de ^{45}Ca . Chaque point représente l'efflux fractionnaire moyen ($\pm$ ES, $n=4$) dans la solution de Locke. Noter que le tracé est interrompu de 270 à 370 min.

(Fig.13) et l'acide éthacrynique (Fig.14). L'augmentation initiale de l'efflux est suivie d'un retour vers les valeurs témoins en présence de Ca externe, mais non en son absence (comparer les Fig.13 A et 13 B). Pour cette raison nous attribuons la réduction secondaire de l'efflux fractionnaire en présence de Ca externe à un abaissement de l'activité spécifique du ^{45}Ca intracellulaire consécutif à l'entrée de ^{40}Ca dans les cellules.

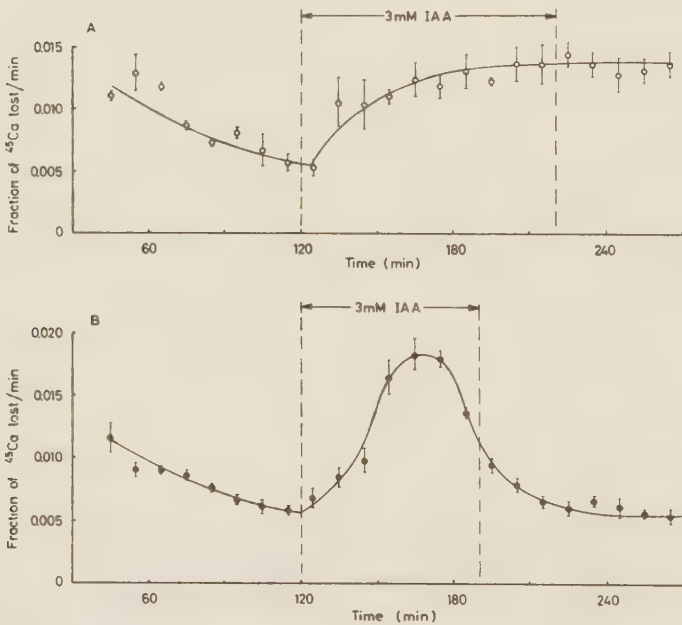


Fig.13. Effet de l'acide iodoacétique sur l'efflux de ^{45}Ca . Chaque point représente l'efflux fractionnaire moyen ($\pm$ ES, n=4) dans la solution de Locke ne contenant pas de Ca (A) ou contenant 2.2 mM de Ca (B).

Les explications suivantes sont proposées pour expliquer l'augmentation de l'efflux de ^{45}Ca observée en présence de substances qui réduisent l'utilisation intracellulaire ou la synthèse d'ATP :

a) Les processus qui assurent l'extrusion du Ca ne dépendent pas directement des concentrations internes de composés phosphorés riches en énergie, mais peuvent fonctionner correctement tant qu'est maintenu un gradient transmembranaire de Na.

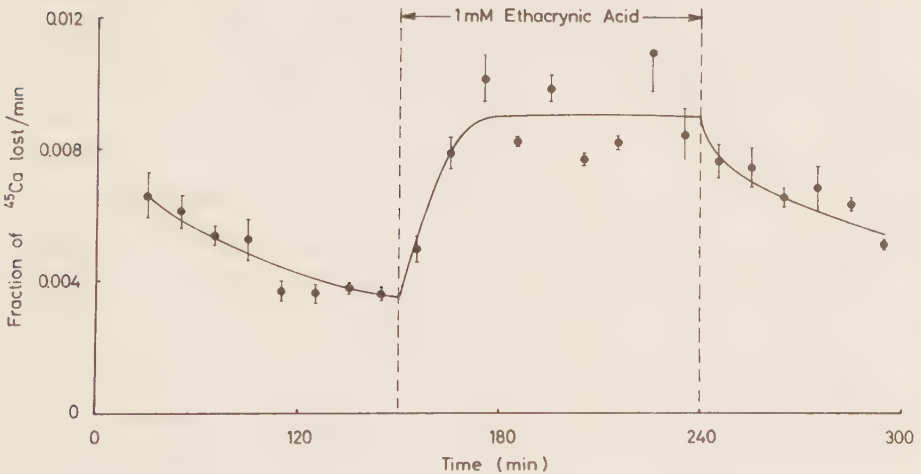


Fig.14. Effet de l'acide éthacryinique sur l'efflux de ^{45}Ca . Chaque point représente l'efflux fractionnaire moyen ($\pm$ ES, n=4) dans une solution de Locke dépourvue de Ca.

b) Une large fraction du Ca intracellulaire est vraisemblablement séquestrée sous une forme non ionisée, notamment dans les mitochondries (CHANCE, 1965; BLAUSTEIN et HODGKIN, 1969). Cette accumulation calcique dans les mitochondries s'effectue contre un gradient de concentration, au moyen d'une "pompe à calcium" (une Mg-ATPase). Lorsque la concentration intracellulaire d'ATP est abaissée sous l'action d'un inhibiteur métabolique, la pompe à calcium est inhibée, ce qui provoque une augmentation du Ca ionisé cytoplasmique et ce faisant, une plus grande efficacité du processus d'expulsion du Ca (cf. Fig.32).

En bref, nos résultats indiquent qu'une fraction importante de l'efflux de Ca ne dépend pas directement de la concentration de composés phosphorylés, mais des gradients ioniques transmembranaires pour le Na et le Ca.

Effet de substances qui réduisent la perméabilité calcique

L'entrée de Ca dans l'axone géant du calmar, qui s'observe en réponse à la dépolarisation membranaire, a pu être décrite d'une manière satisfaisante par deux composantes, l'une de cinétique rapide, l'autre de cinétique plus lente (BAKER, 1972). L'entrée rapide de Ca a été attribuée à sa pénétration dans les cellules au travers des "canaux sodiques" (HODGKIN, 1964); en effet, cette phase rapide a un décours identique à celui de l'augmentation de la perméabilité sodique de la membrane estimée à l'aide de la technique du "potentiel imposé". De plus, le courant entrant rapide de Ca est bloqué en présence de tétrodotoxine (TTX) à des concentrations qui abolissent l'entrée de Na causée par la dépolarisation (BAKER et al., 1971). A l'opposé, la phase "lente" d'entrée de Ca n'est modifiée ni par la TTX, ni par le tétraéthyl-ammonium (TEA), qui interfère sélectivement avec la perméabilité potassique des membranes excitables, et paraît donc emprunter un canal de perméabilité supplémentaire, le "canal calcique (ou calcico-sodique) lent".

Dans le muscle cardiaque et dans d'autres cellules excitables dont le potentiel d'action a une forte composante calcique, la durée de celle-ci est réduite en présence de Co, Mn, Ni, La (REUTER, 1973) et de D₆₀₀, un dérivé méthoxylé du verapamil (KÖHLHARDT et al., 1972a,b).

En outre, ces substances réduisent la sécrétion d'acétylcholine consécutive à la dépolarisation de terminaisons présynaptiques au niveau de la jonction neuromusculaire (DEL CASTILLO et KATZ, 1954; HEUSER et MILEDI, 1971; MEIRI et RAHAMIMOFF, 1971). Elles interfèrent

toutes avec l'augmentation de la perméabilité au Ca de la membrane qui s'observe au cours d'une dépolarisation.

Le Ca pénètre dans une cellule excitable dépolarisée selon son gradient électrochimique et il a été suggéré que Co, Mn, Ni, La et D_{600} n'interfèrent pas avec un transporteur, mais réduisent la perméabilité ionique au niveau des "canaux calciques lents" (BAKER, 1972).

Il convenait de déterminer si l'influx de Ca dans la neurohypophyse en réponse à une dépolarisation membranaire est compatible avec un processus dont le coût énergétique est réduit. Nous avons étudié l'effet d'un abaissement de la température sur l'influx de ^{45}Ca . L'énergie d'activation et le Q_{10} de l'influx de calcium (Fig.15) obtenus ($A=7400$ cal/mole et $Q_{10}=1,45$) suggèrent que l'entrée de calcium provoquée par excès de potassium ne nécessite pas un processus actif.

Nous nous sommes ensuite demandé si le Mn et le Co diminuent aussi l'influx de Ca dans la neurohypophyse et s'ils réduisent la sécrétion hormonale. Les Fig.16 A et 17 A indiquent que l'influx de Ca causé par la dépolarisation cellulaire est abaissé en présence de Mn et de Co et que cet effet est d'autant plus marqué que leur concentration est plus élevée; la sécrétion hormonale est aussi de plus en plus réduite en présence de concentrations croissantes de Mn ou de Co. (Fig.16 B, 17 B, résultats obtenus par J.D. GRAU).

Le milieu de Locke contient normalement 3,2 mM de cations divalents (CaCl_2 2,2 mM, MgCl_2 1,0 mM) et il pourrait être argué qu'une réduction des flux transmembranaires de calcium dans ces expériences ne résulte pas d'une action du Mn et du Co sur les canaux calciques, mais est une conséquence de l'action "stabilisatrice"

au niveau de la membrane de concentrations élevées de cations divalents. Une action sur les canaux de perméabilité calciques en l'absence d'une diminution non spécifique de l'excitabilité membranaire semble établie pour le D_{600} qui agit à des concentrations micromolaires.

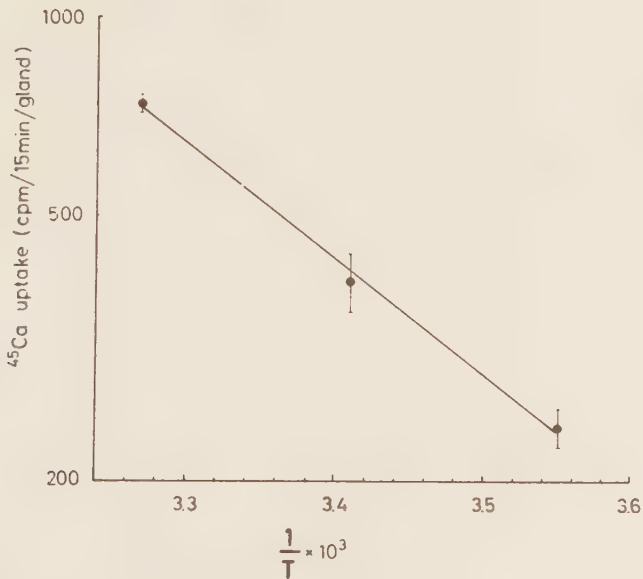


Fig.15. Effet de la température sur l'influx de ^{45}Ca . La radioactivité moyenne ($\pm$ ES, $n=6$, ordonnée) trouvée dans des neurohypophyses incubées dans une solution de Locke-choline contenant 56 mM de potassium est portée en fonction de l'inverse de la température absolue (abscisse).

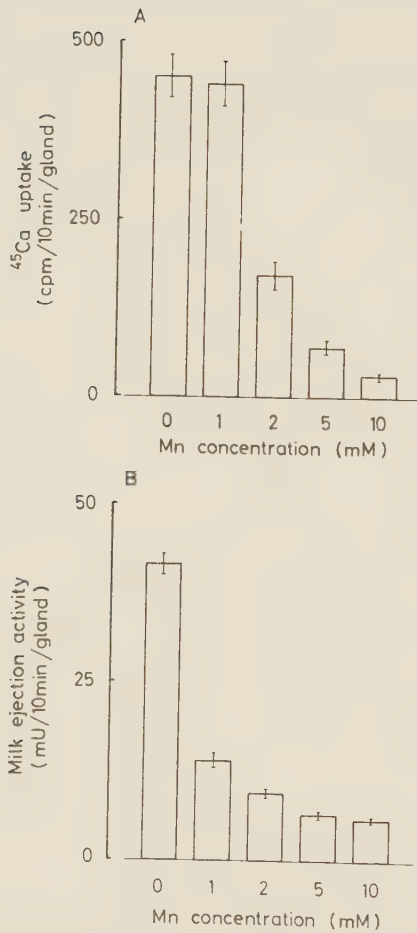


Fig.16. Effets du manganèse sur l'influx de ^{45}Ca (A) et la sécrétion d'ocytocine (B). A, chaque colonne représente l'excédent moyen ($\pm$ ES, $n=6$) de radioactivité trouvé dans des neurohypophyses dépolarisées (par rapport à la radioactivité de témoins non dépolarisés) incubées dans une solution de Locke-choline-K contenant du Mn aux concentrations indiquées en abscisse. B, quantités moyennes ($\pm$ ES, $n=5$) d'ocytocine libérées par un autre groupe de neurohypophyses placées dans les mêmes conditions.

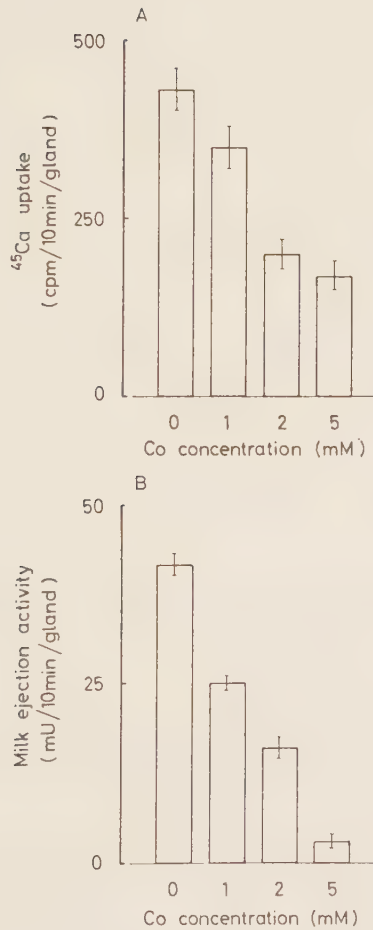


Fig.17. Effets du cobalt sur l'influx de ^{45}Ca (A) et la sécrétion d'ocytocine (B). A, chaque colonne représente l'excédent moyen ($\pm$ ES, n=6) de radioactivité trouvé dans des neurohypophyses dépolarisées incubées dans une solution de Locke-choline-K contenant du Co aux concentrations indiquées en abscisse. B, quantités moyennes ($\pm$ ES, n=5) d'ocytocine libérées.

Cette substance, dont la formule chimique est illustrée dans la Fig.18, a un effet inotrope négatif sur le coeur comparable à celui d'une déficience du milieu externe en Ca et a apparemment une affinité plus grande pour les "canaux calciques lents" que pour les "canaux sodiques" (KOHLHARDT et al., 1972a).

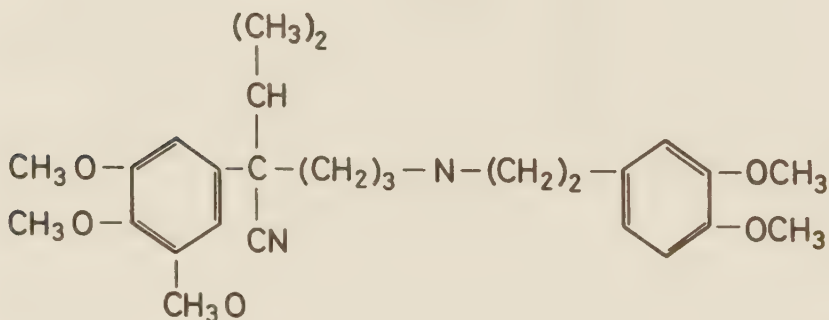


Fig.18. Formule chimique du D₆₀₀

Nous avons observé une réduction significative de la sécrétion et de la captation de ⁴⁵Ca en présence de concentrations de l'ordre de 10⁻² mM (Fig.19). Enfin, une réduction de la captation de ⁴⁵Ca s'observe en présence de La 1-5 mM (Fig.20).

Ces observations indiquent que l'influx de calcium qui accompagne la dépolarisation de neurohypophyses consécutive à une élévation de la concentration de KCl emprunte un canal de perméabilité ionique semblable au "canal lent" au travers duquel le calcium pénètre dans nombre d'autres cellules excitables (BAKER, 1972; REUTER, 1973).

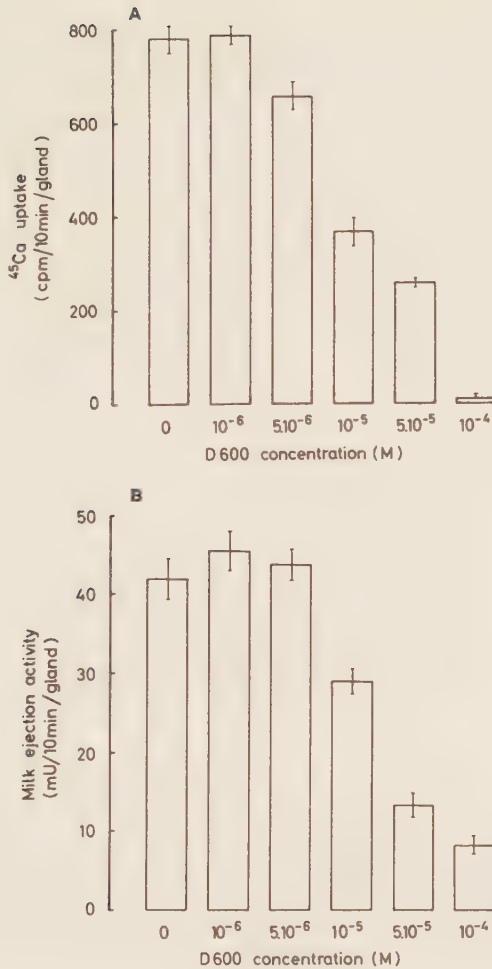


Fig.19. Effets du D₆₀₀ sur l'influx de ⁴⁵Ca (A) et la sécrétion d'ocytocine⁶⁰⁰ (B). A, chaque colonne représente l'excès moyen ($\pm$ ES, n=6) de radioactivité trouvé dans des neurohypophyses dépolarisées incubées dans une solution de Locke-choline-K contenant du D₆₀₀ aux concentrations indiquées en abscisse. B, quantités moyennes ($\pm$ ES, n=5) d'ocytocine libérées.

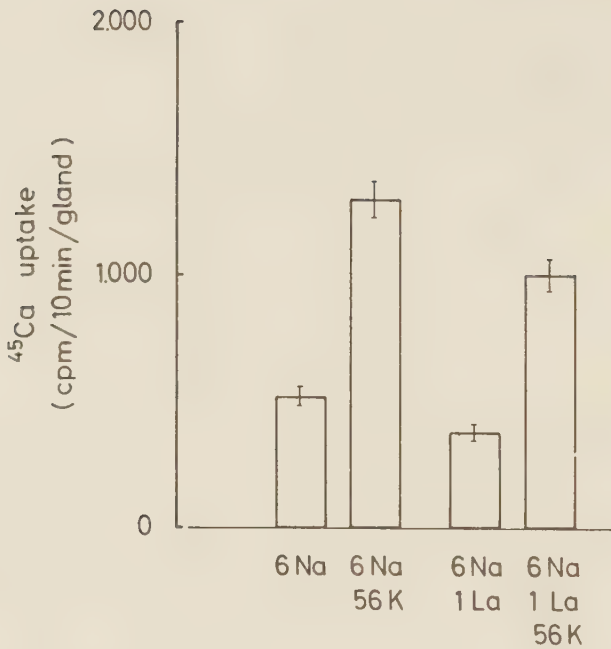


Fig.20. Effet du lanthane sur l'influx de ^{45}Ca . Les colonnes représentent la radioactivité moyenne ($\pm$ ES, 4 n 12) trouvée après 60 min de lavage dans les neurohypophyses dépolarisées (2^e et 4^e colonnes) ou témoins (1^e et 3^e colonnes) en absence ou en présence de 1 mM de La.

A des concentrations qui réduisent ou bloquent l'influx de ^{45}Ca , ni le Mn (Fig.21), ni le D_{600} (0,1 mM), ni le La (1-5 mM) n'ont affecté l'efflux de Ca. Ces résultats suggèrent que dans nos conditions expérimentales la réduction de la sécrétion hormonale en présence de ces substances est causée par leur interférence avec le courant calcique entrant au cours de la dépolarisation membranaire.

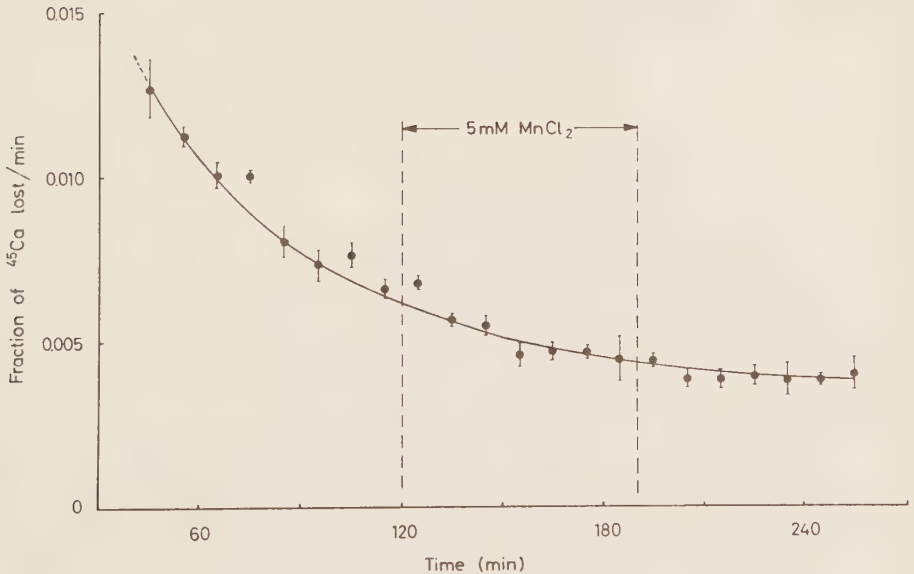


Fig. 21. Effet du manganèse sur l'efflux de ^{45}Ca . Chaque point représente l'efflux fractionnaire moyen ($\pm$ ES, $n=4$) dans la solution de Locke. Le Mn a été ajouté à la solution de lavage pendant la période indiquée.

La phase initiale rapide d'entrée du calcium dans l'axone du calmar a un décours temporel similaire au courant sodique et elle est abolie en présence de TTX. BAKER et al., (1971) ont suggéré que les canaux sodiques ne sont pas entièrement spécifiques, mais laissent aussi passer du calcium. En fait, le courant calcique rapide (I_{Ca}^r) dans l'axone géant peut être décrit de manière satisfaisante par l'équation :

$$I_{Ca}^r = g_{Na} \cdot a(V - E_{Ca}) \quad (4)$$

$$\text{où } a = g_{Ca} / g_{Na} \approx 0,01$$

$$V = \text{potentiel de membrane}$$

$$E_{Ca} = \text{potentiel d'équilibre du calcium}$$

En réponse à une dépolarisation prolongée de la neurohypophyse, une contribution significative de calcium entrant au cours de la phase rapide semble peu probable, puisque la TTX à une concentration qui bloque la genèse des potentiels d'action dans la neurohypophyse, n'affecte ni l'influx de ^{45}Ca (Fig.22), ni les quantités d'hormones libérées par dépolarisation membranaire. Ces résultats suggèrent que dans la neurohypophyse, comme dans l'axone géant (HODGKIN, 1964), l'augmentation de la perméabilité sodique de la membrane qui suit la dépolarisation est rapidement "inactivée".

Si une contribution de calcium entrant par les canaux sodiques paraît exclue dans nos conditions expérimentales, il demeure plausible que cette voie d'entrée de Ca pourrait contribuer significativement à l'éléva-

tion de la concentration de Ca ionisé cytoplasmique lorsque la sécrétion hormonale suit l'invasion des terminaisons neurosécrétrices par des potentiels d'action.

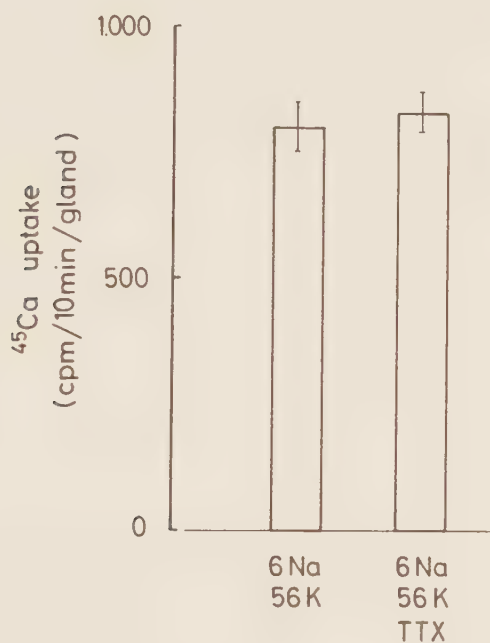


Fig 22. Effet de la tétrodotoxine (TTX) sur l'influx de ^{45}Ca . Les colonnes représentent la radioactivité moyenne ($\pm$ ES, n=6) trouvée après 60 min de lavage dans la solution de Locke-choline dans des neurohyphes dépolarisées en l'absence ou en présence de 10^{-7} g/ml de TTX.

Strontium, substitut du calcium

En réponse à la dépolarisation, la perméabilité membranaire au Ca des cellules de la neurohypophyse s'élève transitoirement et l'influx de calcium qui en résulte déclenche la sécrétion hormonale. La question se pose de savoir si l'augmentation de perméabilité est sélective pour le calcium ou si d'autres ions peuvent emprunter la même voie de pénétration. DOUGLAS et POISNER (1964a,b) ont montré qu'en présence de 10-20 mM de $MgCl_2$ l'influx de calcium observé en réponse à une élévation standard de la concentration externe de KCl est fortement réduit, de même que l'est la sécrétion hormonale. Une des explications possibles de ces observations est que le Mg peut entrer dans les cellules par les mêmes canaux de perméabilité que le calcium, mais n'est pas capable d'activer le processus de sécrétion.

D'autre part, l'ion Ba peut entrer dans les cellules et semble capable d'activer ce processus puisque HALLER et al., (1965) et ISHIDA (1968) ont démontré qu'en présence de Ba la sécrétion basale et la sécrétion provoquée par la dépolarisation sont toutes deux augmentées. Cette augmentation est vraisemblablement due au fait que le Ba peut se substituer au Ca dans le couplage dépolarisation-sécrétion et à une action supplémentaire du Ba sur la perméabilité potassique de la membrane, similaire à celle décrite dans d'autres cellules excitables (cf. REUTER, 1973).

Nous avons étudié l'action sur la sécrétion neurohypophysaire d'un autre cation divalent proche par ses propriétés physico-chimique du calcium, le strontium. Le diamètre ionique du Sr n'est que peu supérieur à celui

du Ca ($1,12 \text{ \AA}$ au lieu de $0,99 \text{ \AA}$).

En l'absence de Ca externe, l'incubation de neurohypophyses dans un milieu dépolarisant n'aboutit pas à une augmentation de la libération hormonale par rapport à la sécrétion basale. L'adjonction de Sr à des neurohypophyses préalablement dépolarisées en l'absence de Ca rétablit la réponse sécrétrice. Cette observation indique que le Sr est capable de se substituer au Ca dans le processus qui aboutit à la sécrétion des hormones neurohypophysaires (BUCHS et al., 1972).

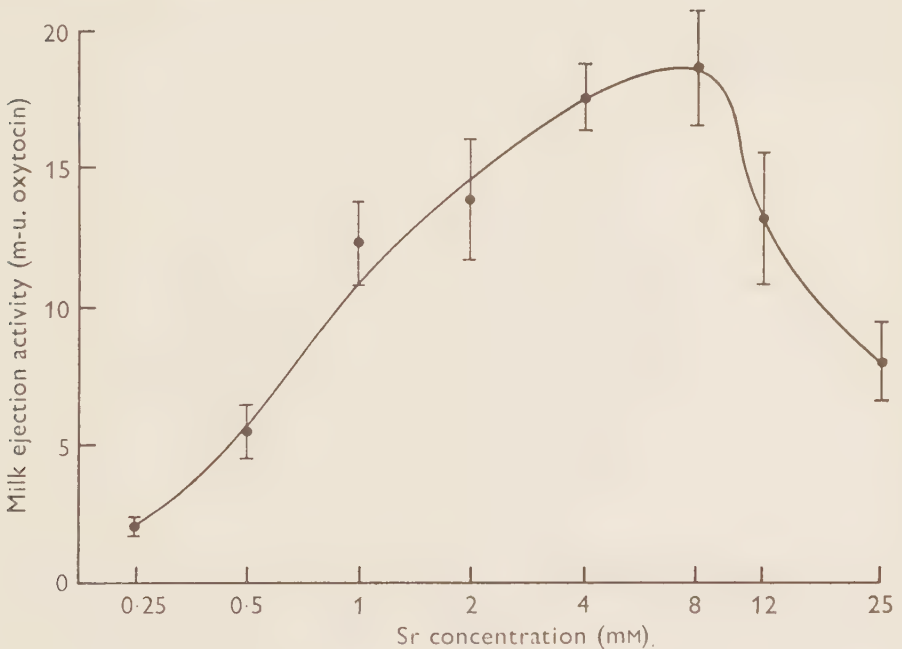


Fig.23. Relation entre la libération d'hormones et la concentration en strontium du milieu externe. Chaque point représente la moyenne des quantités d'ocytocine libérées ($- \text{ES}$, $n=6$) par des neurohypophyses incubées isolément pendant 10 min dans une solution de Locke contenant 0 mM de Ca, 56 mM de K, 50 mM de Na et une concentration de Sr indiquée en abscisse. L'osmolarité a été maintenue par l'adjonction de choline. (D'après BUCHS et al., 1972).

De même qu'en présence de Ca, la libération hormonale en présence de Sr est antagonisée par le Mg et le Na externes (GRAU, 1973). En outre, la sécrétion en réponse à une dépolarisation membranaire augmente progressivement en présence de concentrations croissantes de Sr, passe par un maximum et diminue en présence de concentration de Sr de 5-10 mM (Fig.23).

Afin de déterminer si le Sr entre dans les cellules au cours de la dépolarisation membranaire, nous avons mesuré l'influx de ^{89}Sr dans des conditions expérimentales qui provoquent une sécrétion des hormones neurohypophysaires.

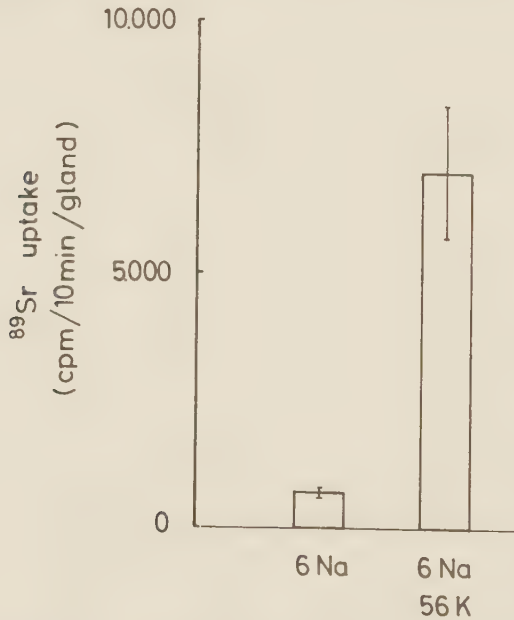


Fig.24. Effet de la dépolarisation membranaire sur l'influx de strontium. Les colonnes représentent la radioactivité moyenne ($\pm$ ES, n=6) trouvée, après 60 min de lavage, dans les neurohypophyses témoins (1^e colonne, 5,6 mM de K) ou dépolarisées (2^e colonne, 56 mM de K) incubées dans une solution de Locke-choline dépourvue de Ca et contenant 2,2 mM de Sr.

La Fig.24 indique que la captation de ^{89}Sr est fortement accrue lorsque le milieu d'incubation contient 56,0 mM au lieu de 5,6 mM de KCl. Dans cette expérience, la concentration externe de Na a été abaissée à 6 mM (l'osmolarité de la solution étant maintenue par la choline), des expériences préliminaires ayant montré que l'influx de Sr est significativement moins élevé en présence de 100 mM de Na. En présence de 20 mM de Mg l'influx additionnel

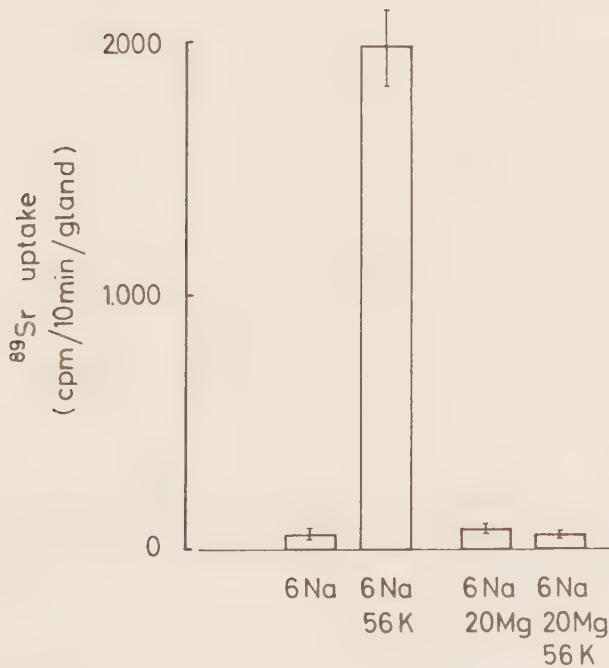


Fig.25. Réduction de l'influx de ^{89}Sr en présence de 20 mM de magnésium. Les colonnes représentent le ^{45}Ca résiduel moyen ($\pm$ ES, n=6) trouvé, après 60 min de lavage, dans la neurohypophyse. Comparer la 2^e et la 4^e colonnes.

de strontium provoqué par la dépolarisation est aboli (Fig.25). L'influx de Sr est aussi fortement réduit en présence de 25,2 mM de cations divalents (Ca 22-Mg 1-Sr 2,2) (Fig.26) et en présence de 0,1 mM de La (Fig.27).

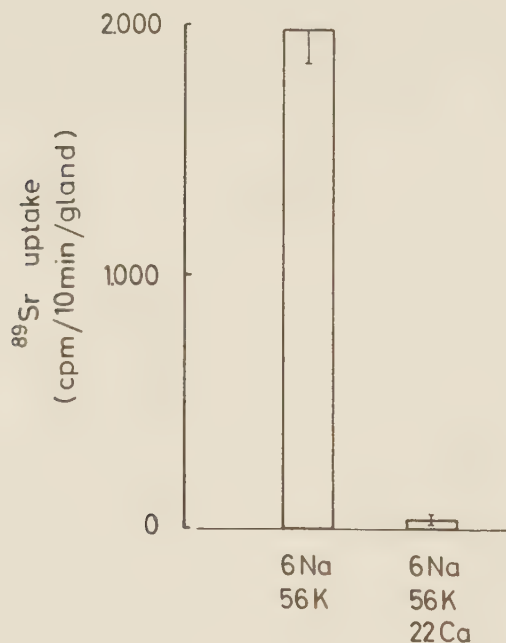


Fig.26. Réduction de l'influx de ^{89}Sr en présence de 22 mM de calcium. Les colonnes représentent le ^{45}Ca résiduel moyen ($\pm$ ES, n=6) trouvé, après 60 min de lavage, dans la neurohypophyse.

Ces résultats indiquent que le Sr peut être substitué au Ca externe dans les processus qui lient la dépolarisation membranaire à la sécrétion des hormones neurohypophysaires. La question de savoir si intracellulairement le Sr agit en soi, ou s'il agit en déplaçant du Ca à partir d'un complexe ne peut pas être tranchée par ces expériences.

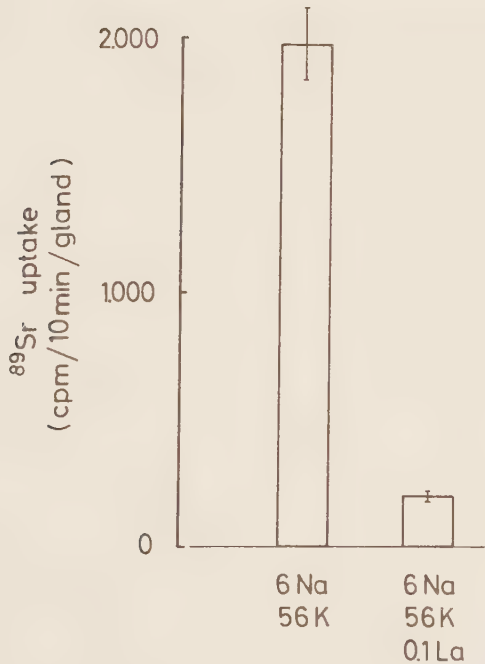


Fig.27. Réduction de l'influx de ^{89}Sr en présence de 0,1 mM de lanthane. Les colonnes représentent le ^{45}Ca résiduel moyen ($\pm$ ES, n=6) trouvé, après 60 min de lavage, dans la neurohypophyse.

Dans nos conditions expérimentales, les cellules accumulent du Sr lorsqu'elles sont incubées dans un milieu Sr- Locke. Etant donné qu'en début d'expérience, les cellules neurohypophysaires ne contiennent pas de Sr, l'interprétation des résultats est facilitée puisque, initialement au moins, on a à faire à un flux unidirectionnel, par opposition aux mouvements transmembranaires de Ca. L'influx de Sr est réduit en amplitude en présence de Na, Mg, La et de fortes concentrations de cations divalents, comme l'influx de Ca lorsque les neurohypophyses sont incubées dans un milieu dépolarisant contenant du Ca; il est donc vraisemblable que le Ca et Sr entrants empruntent les mêmes canaux de perméabilité membranaire.

Sécrétion des hormones neurohypophysaires par exocytose

Comme nous l'avons montré dans les pages précédentes, le Ca joue apparemment un rôle primordial dans les processus qui lient la dépolarisation membranaire à la sécrétion des hormones neurohypophysaires. Au niveau d'une terminaison nerveuse synaptique, où la sécrétion dépend similairement d'un influx de Ca dans l'axone dépolarisé, le médiateur synaptique est toujours libéré en paquets constitués d'un grand nombre de molécules de médiateur (KATZ, 1969). Le médiateur, qui est stocké dans les vésicules synaptiques, est séparé de la membrane post-synaptique par deux barrières, la membrane vésiculaire et la membrane cytoplasmique de la terminaison nerveuse. Sachant que le médiateur est libéré de façon à atteindre les récepteurs d'une manière quasi synchrone et à haute concentration, on peut exclure tout mécanisme qui n'aboutirait pas à l'ouverture simultanée des deux barrières. En conséquence, il a été suggéré que la sécrétion du médiateur résulterait d'un processus d'exocytose (émiocytose) qui suit l'adhésion des vésicules à la membrane cytoplasmique (KATZ, 1969,p.15).

Dans les paragraphes qui suivent nous rapporterons des expériences qui indiquent que la sécrétion des hormones neurohypophysaires s'effectue vraisemblablement par un mécanisme similaire.

La neurohypophyse est constituée essentiellement par les prolongements axoniques des neurones supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus. Ces axones amyéliniques ont un diamètre de $0,2 - 0,5 \mu$, sauf au niveau de dilatations qu'on peut observer le long de leur parcours (corps de Herring) où leur diamètre peut atteindre plusieurs μ . Ils contiennent des inclusions typiques

de prolongements nerveux (neurotubules, mitochondries, etc.), ainsi que des granules d'environ 150 nm de diamètre: les granules de neurosécrétion. Une membrane délimite dans ces granules un espace approximativement sphérique occupé par un matériel osmophile; les hormones neurohypophysaires s'y trouvent concentrées en association avec des protéines, des lipides et des nucléotides.

Les méthodes de centrifugation différentielle d'homogénats de neurohypophyses ont permis l'obtention dans plusieurs laboratoires de fractions riches en granules de neurosécrétion non contaminées par d'autres organites intracellulaires (WEINSTEIN et al., 1961). Le fait de disposer de ces fractions a permis de déterminer la composition chimique des granules de neurosécrétion et de montrer que l'ocytocine et la vasopressine y sont liées (HOLLENBERG et HOPE, 1968) à des protéines spécifiques, d'un poids moléculaire d'environ 10'000, et appelées du terme collectif de "neurophysines" (ACHER et al., 1956).

On a estimé que les neurophysines représentent environ 50% du contenu total en protéines et 60% environ du contenu en protéines solubles des granules de neurosécrétion (GINSBURG et IRELAND, 1966; DEAN et HOPE, 1968). Dans les granules de neurosécrétion, neurophysines et hormones sont présentes en quantité équimolaire.

Comme les hormones qui sont sécrétées à partir des terminaisons neurosécrétrices stimulées proviennent des granules de neurosécrétion, deux mécanismes de sécrétion peuvent être envisagés (DREIFUSS, 1973) :

- a) soit les hormones diffusent d'abord au travers de la membrane granulaire dans l'axoplasme et, dans un deuxième temps, de là vers le milieu extracellulaire.
- b) soit les granules déversent leur contenu directe-

ment dans l'espace extracellulaire par un processus d'exocytose, sans que les hormones n'entrent en contact avec le cytoplasme.

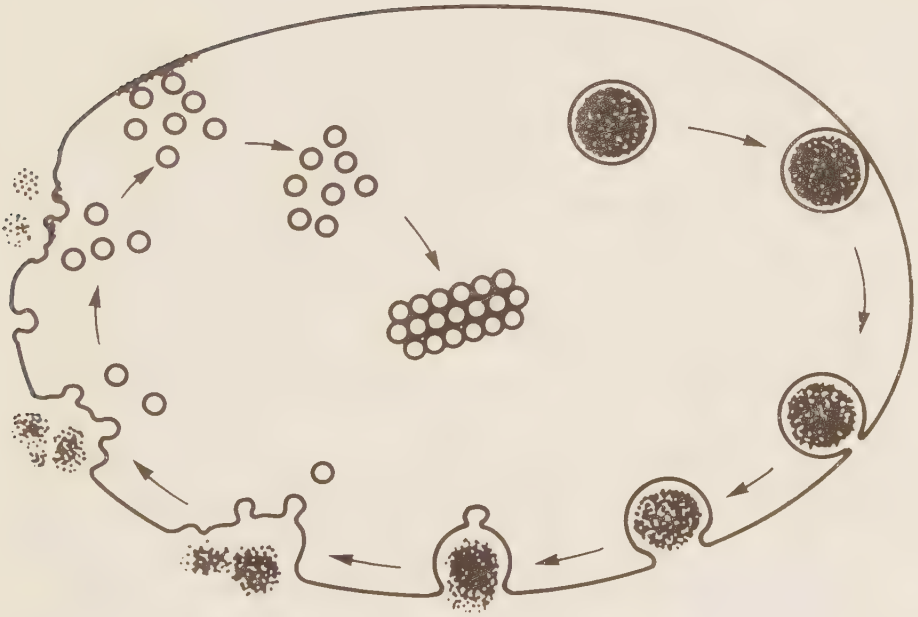


Fig.28. Schéma des étapes aboutissant à une sécrétion par exocytose à partir d'un granule de neurosécrétion. Le granule adhère à la membrane cellulaire dépolarisée et déverse son contenu dans l'espace externe au travers d'un canal qui met le contenu granulaire en continuité avec l'espace extracellulaire. La membrane du granule est retrouvée dans la terminaison après un processus d'endocytose sous forme de microvésicules. (D'après DOUGLAS et al., 1971, fig. 40).

Les étapes aboutissant à une sécrétion par exocytose sont schématisées dans le Fig.28. Lorsqu'une collision survient entre un granule et la membrane cytoplasmique, une réorganisation de la structure membranaire s'ensuit qui aboutit à une forte augmentation de la perméabilité cellulaire au site d'accolement, permettant au contenu du granule de diffuser dans l'espace extracellulaire.

Des images ont été publiées en microscopie électronique qui montrent des granules de neurosécrétion accolés à la membrane cytoplasmique et dont le contenu est en continuité avec l'espace extracellulaire par un canal, de même que des régions où du matériel osmiophile semblable à celui qui occupe l'intérieur des granules se trouve localisé extracellulairement près d'une invagination de la membrane d'une terminaison neurosécrétrice. De telles images, obtenues dans la neurohypophyse du hamster et du rat (NAGASAWA et al., 1970; DOUGLAS et al., 1971; KRISCH et al., 1972), sont caractéristiques d'un processus d'exocytose.

Dans la médullo-surrénale, où la libération d'adrénaline et de noradrénaline s'effectue par exocytose à partir de granules, on a détecté, en réponse à la stimulation, l'apparition simultanée dans l'espace extracellulaire de ces catécholamines et de tous les autres constituants solubles contenus dans les organites de stockage; à l'opposé, les constituants des membranes granulaires et des substances d'origine cytoplasmique ne sont pas sécrétées (SCHNEIDER et al., 1967; SMITH et WINKLER, 1972). Dans le but de voir si une approche expérimentale de ce type pouvait être appliquée à la neurohypophyse, nous avons tenté de déterminer si, dans différentes conditions expérimentales, une libération de neurophysines

accompagne obligatoirement la sécrétion d'hormones neurohypophysaires.

Des neurohypophyses ont été attachées par la tige pituitaire à une électrode de platine et plongées dans une solution de Locke aérée avec 5% CO₂ et 95% O₂ et maintenue à 37°C. Après 10 min d'incubation, les préparations ont été transférées dans une solution de Locke-choline. 20 min plus tard, les neurohypophyses ont été stimulées électriquement entre l'électrode de support et une électrode indifférente plongée dans le bain. Les paramètres de stimulation suivants ont été utilisés: durée de la stimulation 30 sec, impulsions biphasiques de 2 msec, intensité 0,25 - 10,0 mA, fréquence 50 Hz, puis la glande a été réimmergée pendant 10 min dans la solution de Locke-choline. Les hormones retrouvées après cette ultime incubation ont été dosées biologiquement et les neurophysines ont été dosées par la méthode radio-immunologique.

La stimulation déclenche une sécrétion conjointe d'ocytocine et de neurophysines qui est fonction de l'intensité de stimulation (Fig.29). La Fig.30 illustre pour le même groupe d'expériences la relation existant entre la quantité de neurophysines et celle d'ocytocine trouvées dans le milieu d'incubation. Nous avons cherché à déterminer si une enzyme cytoplasmique, la déshydrogénase lactique (LDH), s'échappait également dans le milieu extracellulaire lors du processus de sécrétion. Le fait que la perte de LDH par le tissu neurohypophysaire n'est pas modifiée significativement en présence d'un excès de KCl externe (MATTHEWS et al., 1973) indique que la sécrétion hormonale ne s'accompagne pas d'une augmentation généralisée de la perméabilité membranaire aux peptides et aux protéines, une observation qui est en accord avec

l'hypothèse d'une sécrétion des hormones neurohypophysaires par exocytose.

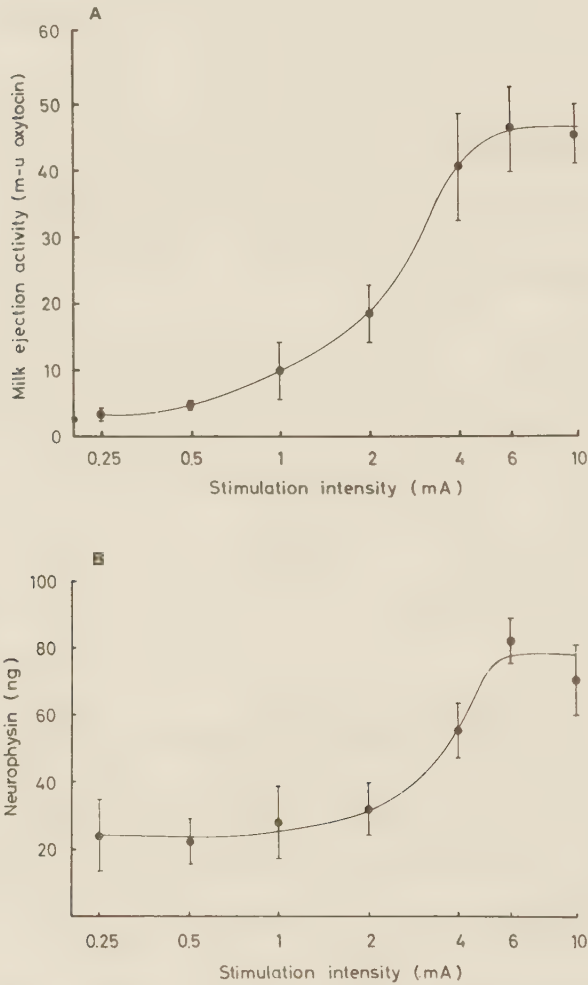


Fig.29. Libération d'hormones (A) et de neurophysine (B) en fonction de l'intensité de la stimulation électrique. Les points représentent la quantité moyenne de substance ($\pm$ ES, $n=8$) libérée aux intensités indiquées en abscisse.

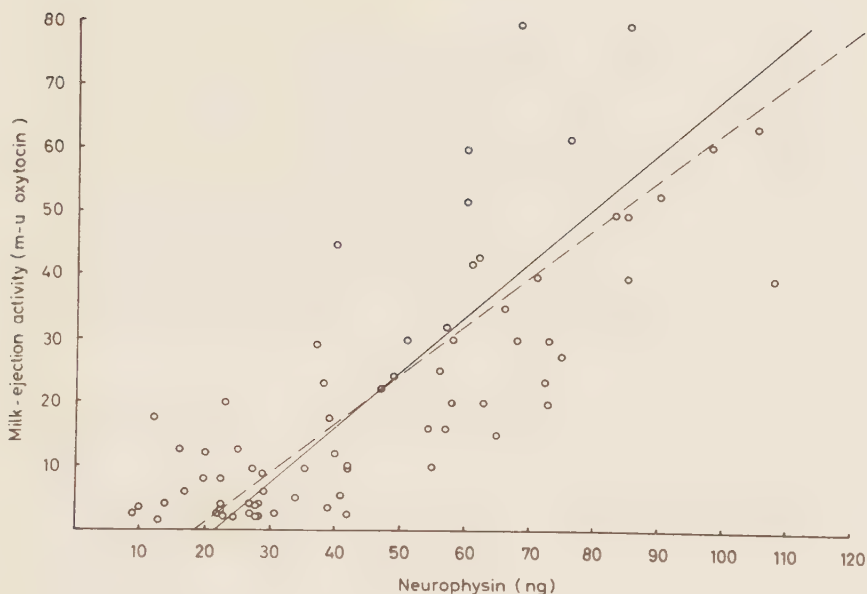


Fig.30. Relation entre la libération d'hormones et de neurophysine à partir de neurohypophyses stimulées électriquement. Pour chaque incubat, le contenu en ocytocine a été porté en ordonnée et le contenu en neurophysine en abscisse. Les droites de régression, obtenues à partir de 72 points, ont un coefficient de corrélation de 0,92. Mêmes données expérimentales que celles de la Fig.29.

DISCUSSION

Nous nous proposons de discuter les résultats rapportés dans ce travail en fonction de la théorie calcique du couplage dépolarisation-neurosécrétion, de l'hypothèse que la sécrétion des hormones neurohypophysaires s'effectue par un processus d'exocytose, du rôle possible du calcium dans ce processus et des mécanismes cellulaires qui assurent le maintien d'une concentration constante de Ca ionisé intracellulaire.

Théorie calcique du couplage dépolarisation-sécrétion

Nos résultats sont compatibles avec l'hypothèse qui attribue un rôle clé à l'élévation de la concentration interne de Ca ionisé dans la séquence des événements qui lient la dépolarisation membranaire à la sécrétion hormonale. En essence, cette hypothèse postule que lorsque les terminaisons neurosécrétrices sont transitoirement dépolarisées, du calcium diffuse du milieu externe dans les cellules et, ce faisant, déclenche le processus sub-cellulaire qui aboutit à la libération des hormones neurohypophysaires.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode directe qui permette d'estimer la concentration interne de Ca ionisé dans des cellules de petite taille. Sur la base de résultats obtenus après injection dans des cellules volumineuses de mélanges de Ca et d'un chélateur du Ca (PORTZEHL et al., 1964, cf. BAKER et al., 1971), la concentration cytoplasmique de Ca ionisé y a été estimée comme étant de l'ordre de 10^{-8} - 10^{-7} M. Dans la neurohypophyse, où la concentration de Ca ionisé n'a pas été

déterminée, nous l'avons considérée comme étant a priori du même ordre de grandeur. Le calcium ionisé ne représente qu'une faible fraction du Ca interne total, le reste étant sous forme liée ou retenu dans les mitochondries. Dans nombre de tissus excitables (muscle lisse, muscle cardiaque, muscle squelettique d'invertébrés) un influx de calcium pendant la dépolarisation contribue d'une manière significative au transfert de charge qui est à l'origine du potentiel d'action (REUTER, 1973). A l'opposé, la contribution du courant calcique à la forme du potentiel d'action nerveux est d'environ 100 fois inférieure à celle du courant sodique entrant (HODGKIN et KEYNES, 1957). Néanmoins, un courant calcique entrant joue un rôle fonctionnel essentiel dans les processus de neurosécrétion à partir de terminaisons axoniques (DOUGLAS, 1968, KATZ, 1969).

Compte tenu que dans le cytoplasme, la concentration de Ca ionisé Ca_i est inférieure à $10^{-6}M$ et que la concentration externe de Ca ionisé Ca_e est supérieure à $10^{-3}M$, on peut calculer, à l'aide de l'équation 5 que le potentiel d'équilibre du calcium, E_{Ca} , est supérieur à + 90 mV.

$$E_{Ca} = 30 \log \frac{Ca_e}{Ca_i} \quad (5)$$

La loi de Kirchhoff prédit que le courant calcique, I_{Ca} , dépend de la conductance membranaire au calcium, g_{Ca} , et de la force électromotrice du calcium ($V - E_{Ca}$) selon la formule

$$I_{Ca} = g_{Ca} (V - E_{Ca}) \quad (6)$$

où V = potentiel de membrane

Un courant calcique entrant s'observe si $(V-E_{Ca}) < 0$, un courant de calcium sortant si $V-E_{Ca} > 0$.

Dans des circonstances habituelles où $V \ll E_{Ca}$ une augmentation de g_{Ca} se traduit par un courant calcique entrant.

Dans la synapse géante du ganglion stellaire du calmar, la preuve que la sécrétion du médiateur au niveau de la terminaison présynaptique en réponse à la dépolarisation membranaire dépend critiqueusement du courant calcique entrant a été fournie par KATZ et MILEDI (1967). Ces auteurs ont montré qu'on observe une sécrétion du médiateur au cours d'expériences où le potentiel de membrane de la terminaison présynaptique est maintenu dépolarisé à la condition que $V < E_{Ca}$.

L'hypothèse que la sécrétion des hormones neurohypophysaires dépend également d'un influx de calcium dans les terminaisons neurosécrétrices a été proposée par DOUGLAS (1963). Il a montré qu'une dépolarisation membranaire ne provoque une sécrétion qu'en présence de calcium externe. DOUGLAS et POISNER (1964a) ont montré que la sécrétion en réponse à une élévation standard de la concentration de Ca externe est antagonisée par une concentration élevée de Mg et que les situations expérimentales où un taux de sécrétion hormonale accru s'observe s'accompagnent, dans la règle, d'une augmentation de la perméabilité membranaire au calcium. Dans notre travail, les mouvements transmembranaires de Ca ont été suivis grâce à l'utilisation de l'isotope ^{45}Ca . Lorsque la sécrétion hormonale et l'influx de ^{45}Ca ont été comparés dans diverses situations expérimentales, tous deux ont varié dans le même sens. Ainsi, la dépolarisation membranaire causée par un excès de KCl externe, qui provoque une sécrétion accrue des hormones neurohypophysaires

(DOUGLAS, 1963, DICKER, 1966, ISHIDA, 1968), s'accompagne d'un influx augmenté de ^{45}Ca . La sécrétion hormonale est accrue lorsque le Na externe est substitué par la choline (DREIFUSS et al., 1971); en accord avec l'hypothèse calcique, la quantité de Ca retenue dans les glandes après dépolarisation est d'autant plus élevée que la concentration externe de Na est basse.

Il faut cependant noter que la sécrétion hormonale double approximativement lorsque la concentration de Na du milieu d'incubation est abaissée de 100 mM à 50 mM de Na (Fig.1), alors que la captation supplémentaire de ^{45}Ca n'augmente que d'environ 50% dans ces conditions (Fig.2 B). En réalité, un accord quantitatif entre les données sécrétrices et celles qui concernent les mouvements calciques n'est pas attendu car

- a) l'estimation des mouvements calciques globaux ne tient pas compte du fait que seule une fraction du Ca ionisé entrant dans les cellules active la sécrétion.
- b) il est possible qu'un petit nombre d'ions calciques peuvent causer la sécrétion du contenu d'un granule de neurosécrétion, lequel contient peut-être 1'000 molécules hormonales (GINSBURG et IRELAND, 1966). Au niveau de la jonction neuromusculaire, il a été estimé que 4 ions Ca peuvent promouvoir la sécrétion d'un "quantum" d'acétylcholine, soit 1'000 - 10'000 molécules (DODGE et RAHAMIMOFF, 1967).
- c) enfin, la concentration externe de Na n'affecte pas seulement l'influx, mais aussi l'efflux de calcium. Lorsque les préparations ont été dépolarisées en présence d'un bloquant de la perméa-

bilité membranaire au calcium, nous avons observé une réduction plus ou moins parallèle de la sécrétion hormonale et de l'influx de calcium. Ces substances, aux concentrations utilisées, n'ont pas eu d'effet sur l'efflux de calcium (Fig.21). Elles bloquent les pores calciques (ou calcico-sodiques) dans l'axone (BAKER et al., 1971, MEIRI et RAHAMIMOFF, 1972, BAKER, 1973) et dans le coeur (KOHLEHARDT et al., 1972a,b).

Il est permis de conclure

- a) que la sécrétion hormonale est activée lorsque la concentration interne de Ca ionisé est augmentée
- b) que le calcium entre dans les cellules en diffusant le long de son gradient électro-chimique et
- c) qu'il passe au travers de canaux membranaires qui ne diffèrent pas de ceux d'autres cellules excitables. Nous pensons, par analogie avec la jonction neuromusculaire, où un abaissement du Na externe cause une potentialisation de la neurosécrétion (HUBBARD, 1970, p.91), et par analogie avec le muscle cardiaque, dont la force de contraction dépend du rapport $Ca : Na^2$ (LUTTGAU et NIEDERGERKE, 1958), que c'est pour l'occupation de ces canaux membranaires qu'il y a vraisemblablement compétition entre le Na et le Ca externes.

Sécrétion des hormones neurohypophysaires par exocytose

La question du rôle intracellulaire du Ca ne pourra être abordée qu'après discussion des théories de sécrétion. Il y a encore quelques années, deux théories étaient proposées, la théorie de la dissociation cytoplasmique des complexes hormones-neurophysines, et celle de la sécrétion par exocytose. Elles sont schématisées dans la Fig.31.

Les tenants de la théorie de la sécrétion hormonale après dissociation cytoplasmique des liaisons entre hormones et neurophysines postulent que la membrane des terminaisons neurosécrétrices dépolarisées est perméable aux hormones et imperméable aux neurophysines; en conséquence, les hormones pourraient diffuser jusque dans la lumière des capillaires, tandis que les neurophysines seraient retenues dans les cellules.

Une donnée expérimentale incompatible avec cette hypothèse est l'observation d'une forte réduction de la concentration de neurophysines dans la neurohypophyse dans des conditions expérimentales qui s'accompagnent d'une sécrétion hormonale importante (RENNELS, 1966; FRIESEN et ASTWOOD, 1967).

Cette chute résulte de la sécrétion conjointe des neurophysines et des hormones et s'accompagne d'une élévation du taux plasmatique des neurophysines (FAWCETT et al., 1968).

La sécrétion des neurophysines dépend des mêmes espèces ioniques que la sécrétion hormonale. La libération de neurophysines à partir de neurohypophyses incubées in vitro est accrue par la stimulation électrique (Fig.29) ou par une élévation de la concentration externe de potassium en présence de calcium (FAWCETT et al., 1968;

Dissociation du complexe

Exocytose

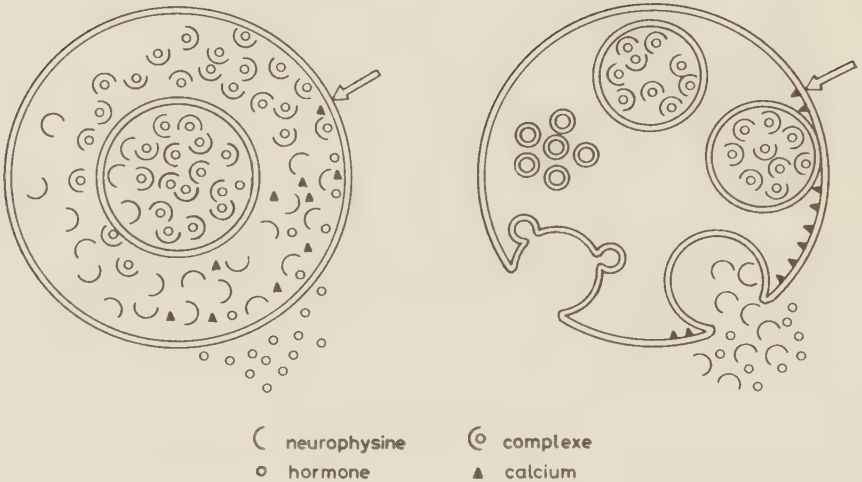


Fig.31. Théories de sécrétion des hormones neurohypophysaires. Deux terminaisons neurosécrétrices sont schématisées sous la forme de cercles qu'il convient de regarder en partant d'en haut, puis en suivant le sens des aiguilles d'une montre.

A gauche, dissociation cytoplasmique des complexes formés par les hormones et les neurophysines. Dans la terminaison au repos, un compartiment hormonal cytoplasmique est en équilibre avec les hormones contenues dans les (un seul est illustré) granules de neurosécrétion. L'entrée de calcium qui suit la dépolarisation de la membrane cellulaire (flèche) dissocie les complexes cytoplasmiques. Seules les hormones peuvent diffuser vers l'extérieur au travers de la membrane cellulaire. Le compartiment hormonal cytoplasmique se reconstitue ensuite à partir des granules.

A droite, étapes aboutissant à la sécrétion par exocytose. Hormones et neurophysines sont contenues dans les granules de neurosécrétion. L'entrée de calcium favorise l'adhésion des granules à la membrane cellulaire et provoque la fusion-et-rupture des deux membranes. L'existence d'une continuité entre l'espace intragranulaire et le milieu extracellulaire permet la diffusion des complexes vers l'extérieur où, en présence d'une concentration plus élevée de calcium, ils sont dissociés. Un processus de recaptage et de fragmentation de la membrane des granules aboutit ensuite à la formation de microvésicules dans les terminaisons. (D'après DREIFUSS, 1973).

UTTENTHAL et al., 1971) et diminuée en présence de concentrations élevées de Mg et de Na (CHENG et al., 1972). Les neurophysines apparaissent dans l'incubat non accompagnées de protéines cytoplasmiques (EDWARDS et al., 1973; MATTHEWS et al., 1973); cette observation indique que leur libération ne résulte pas d'une augmentation généralisée de la perméabilité cellulaire aux protéines.

Lorsque les quantités de neurophysines sécrétées sont portées sur un graphique en fonction du contenu hormonal des mêmes incubats, on note l'existence d'une excellente corrélation (Fig.30), qui indique qu'hormones et neurophysines sont libérées dans un rapport constant. Dans les granules de neurosécrétion, hormones et neurophysines coexistent en proportion équimolaire (SACHS, 1970). Si la sécrétion des hormones neurohypophysaires s'effectue exclusivement par exocytose et si les neurophysines ne sont pas recaptées, hormones et neurophysines devraient se retrouver en concentration équimolaire dans le plasma sanguin ou dans le milieu d'incubation. Comme le rapport des poids moléculaires de ces deux constituants granulaires est voisin de 10, on devrait retrouver environ 10 ng de neurophysines par ng d'hormones sécrétées. L'estimation par méthode radio-immunologique des quantités de neurophysines libérées aboutit à un rapport pondéral neurophysines/hormones de 1-2 au lieu de 10 (UTTENTHAL et al., 1971; LEGROS et al., 1971), mais il convient de noter que les méthodes radio-immunologiques sous-estiment aussi (par un facteur de 5-10) le contenu total de la neurohypophyse en neurophysines.

Rôles possibles du calcium dans le processus d'exocytose

Si la sécrétion des hormones neurohypophysaires s'effectue par exocytose, il convient de se demander par quel (s) mécanisme (s) un flux transmembranaire de calcium peut favoriser l'adhésion de granules de neurosécrétion à la membrane cytoplasmique et promouvoir l'expulsion du contenu des granules. Nous ne pouvons qu'émettre quelques hypothèses.

Une particule de la dimension d'un granule de neurosécrétion est sujette au mouvement brownien. A température constante, le déplacement moyen par unité de temps d'un granule est inversement proportionnel à la racine carrée de la viscosité du milieu dans lequel elle se trouve (MATTHEWS, 1970). La viscosité de l'axoplasme d'une terminaison neurosécrétrice n'est pas connue, mais on peut admettre qu'elle est du même ordre que celle du myoplasme (0,3 poises). Le cytoplasme de l'axone géant du calmar, qui a la consistance d'un gel, peut être réversiblement liquéfié par des ions divalents, tout particulièrement par le calcium (HODGKIN et KATZ, 1949; CHAMBERS et KAO, 1952). Le calcium qui pénètre dans les terminaisons neurosécrétrices au moment de la dépolarisation membranaire pourrait réduire la viscosité du cytoplasme dans les régions sous-membranaires. Par voie de conséquence, la distance moyenne parcourue par les granules de neurosécrétion dans les régions périphériques des terminaisons nerveuses serait accrue, de sorte que la probabilité d'accolement avec la membrane cytoplasmique serait augmentée. Des mouvements browniens d'organites intracellulaires dans les cellules ganglionnaires et l'accélération de ces mouvements en réponse à la dépolarisation membranaire en présence de calcium ont

été récemment décrits (SHAW et NEWBY, 1972).

Pour permettre la fusion de deux membranes, la surface externe des granules de neurosécrétion doit adhérer à la face interne de la membrane cytoplasmique. Peu de données expérimentales sont disponibles sur les propriétés physiques et chimiques de ces surfaces. POISNER et DOUGLAS (1968b) et VILHARDT et JØRGENSEN (1972) ont placé une suspension de granules de neurosécrétion dans un champ électrique; à pH physiologique, ils sont chargés électronégativement puisqu'ils migrent vers l'anode. En fait, la membrane de la plupart des cellules possède une charge de surface de -10 à -25 mV sur les faces externe et interne (MATTHEWS, 1970). Il est possible que la membrane cytoplasmique des terminaisons neurosécrétrices de la neurohypophyse soit chargée similairement. Une barrière électrostatique s'opposerait alors à l'adhésion entre granules de neurosécrétion et membrane cytoplasmique; seuls de très rares granules de neurosécrétion pourraient être animés d'une énergie cinétique suffisante pour franchir cette barrière dans une cellule au repos. Un rôle éventuel du flux transmembranaire de calcium au moment de la dépolarisation de la membrane cytoplasmique pourrait être de réduire provisoirement - ou même d'inverser - le potentiel de surface de sa face interne. Selon cette théorie, les ions calciques peuvent promouvoir la sécrétion hormonale sans diffuser au-delà de la face interne de la membrane cytoplasmique.

Il est vraisemblable, qu'en plus de son action éventuelle sur la viscosité axoplasmique et le potentiel de surface de la membrane cytoplasmique, le Ca ionisé cytoplasmique intervienne dans d'autres étapes du processus qui aboutit à la sécrétion des hormones neurohypophysaires.

L'observation de la forte dépendance thermique du délai synaptique au niveau de la jonction neuromusculaire qui a un $Q_{10} \sim 4$ (KATZ et MILEDI, 1967a) suggère que l'une au moins des étapes qui précèdent la libération d'acétylcholine dans cette préparation implique un processus actif. Dans la neurohypophyse aussi, des données indirectes suggèrent une participation de nucléotides riches en énergie à la sécrétion hormonale.

L'adjonction de calcium en concentration millimolaire n'accélère pas l'efflux du contenu soluble de granules de neurosécrétion mis en suspension dans une solution isotonique de chlorure de potassium; par contre, les quantités d'hormones et de neurophysines qui apparaissent dans le surnageant augmentent d'environ dix fois en présence d'ATP et de Ca ou de Mg (POISNER et DOUGLAS, 1968a,b). Une intervention de ce nucléotide riche en énergie est aussi suggérée par l'effet inhibiteur sur la libération hormonale in vitro de bloquants de la synthèse de l'ATP (DOUGLAS et al., 1965a). Il a été postulé qu'une interaction pourrait avoir lieu entre l'ATPase des granules de neurosécrétion et l'ATP membranaire (DOUGLAS et POISNER, 1968a). Un modèle d'interaction de ce type a aussi été proposé pour la médullo-surrénale, où la sécrétion des catécholamines à partir des granules de stockage dépend également de la présence d'ATP (POISNER et TRIFARO, 1967).

Une action supplémentaire du Ca dans les processus qui aboutissent à la sécrétion hormonale doit être envisagée puisque le Mg inhibe la libération des hormones neurohypophysaires, alors même qu'il est capable, comme le Ca, de liquéfier le cytoplasme, de neutraliser des charges fixes négatives et d'activer l'ATPase granulaire.

De plus, il faut admettre que le Mg ionisé est présent en concentration millimolaire dans l'axoplasme, par analogie avec les estimations de BAKER et CRAWFORD (1972) dans l'axone du calmar.

Il faut envisager soit que le Mg interfère avec le Ca dans une autre réaction enzymatique, soit qu'il entre en compétition avec le Ca pour l'entrée dans la cellule dépolarisée. Une interprétation définitive de cet antagonisme ionique ne peut pas être fournie pour le moment.

Mécanismes qui assurent le maintien à long terme de la concentration cytoplasmique de calcium ionisé

Nous avons discuté précédemment l'hypothèse selon laquelle la sécrétion hormonale augmente avec l'augmentation de la concentration cytoplasmique de Ca ionisé. Si cette dernière a été temporairement augmentée, le statu quo ante n'est rétabli que lorsque le calcium entré dans les cellules en a été réexpulsé. Nos résultats suggèrent qu'une fraction importante de l'efflux de Ca interne est couplée à l'influx d'ions monovalents diffusibles, notamment de Na. Dans nos conditions expérimentales, l'efflux de ^{45}Ca tombe à environ 55% de sa valeur initiale lorsque la solution d'incubation est dépourvue de Na et à des valeurs intermédiaires entre 100% et 55% lors de substitutions partielles du Na externe. Lors d'un échange Ca interne - Na externe, une partie de l'énergie requise pour expulser le Ca dans le milieu externe pourrait dériver de l'énergie contenue dans le gradient de concentration transmembranaire du Na. Le fait que l'efflux calcique total a un Q_{10} d'environ 2 est compatible avec un processus peu coûteux du point de vue énergétique.

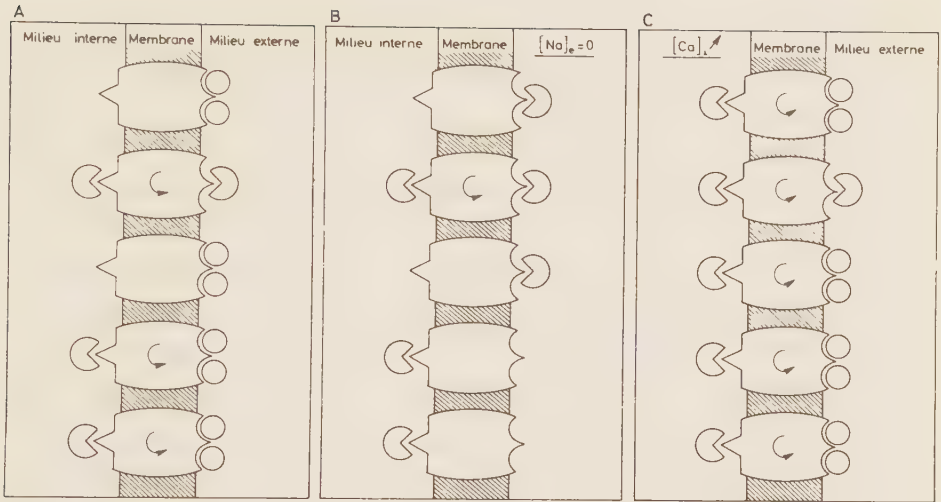


Fig.32. Schémas du fonctionnement possible de l'échange calcium interne - sodium externe. Les transporteurs membranaires sont représentés en blanc dans la membrane autrement hachurée; ils possèdent des sites internes et externes aux affinités différentes pour le Ca (C) et le Na (O). Le transporteur n'effectue une translocation ionique (symbolisée par la flèche) que lorsque tous ses sites sont occupés. A, Condition normale, où quelques sites internes sont occupés par du Ca et les sites externes sont surtout occupés par du Na. B, Substitution du Na externe; elle se traduit par une diminution de l'efflux de Ca. C, Augmentation de la concentration cytoplasmique du Ca interne; l'efflux de Ca est accru comme conséquence d'une occupation d'un plus grand nombre de sites internes.

A l'heure actuelle, nous ne disposons que de peu de données expérimentales sur la fraction de l'efflux de Ca qui ne dépend pas de la concentration transmembranaire de Na, si ce n'est qu'elle a un Q_{10} d'environ 1,25 qui est probablement indicatif d'un phénomène passif tel que "relâchement" du calcium fixé aux membranes ou à d'autres constituants chargés électronégativement de la préparation.

La Fig.32 illustre d'une manière schématique un des fonctionnements possibles du processus d'échange Ca interne - Na externe. On peut imaginer qu'une protéine constitutive de la membrane a un groupe de sites électro-négatifs tournés vers le milieu interne et un autre groupe de sites électronégatifs accessibles au milieu externe. Lorsque les sites internes et externes sont occupés par des ions mono- ou divalents, la protéine est capable d'effectuer une translocation qui se traduit par l'entrée dans le cytoplasme des ions fixés sur les sites externes et le transport vers la face externe de la membrane des ions fixés sur les sites internes. Lorsque les sites de la protéine ne sont que partiellement occupés, elle serait stable, c'est-à-dire incapable de translocation ionique. De plus, il faut spéculer que les sites internes et externes ont des affinités différentes pour le Na et le Ca : les sites qui font face au milieu extracellulaire auraient une grande affinité pour le Na et une moindre affinité pour le Ca; de ce fait, la plupart des sites externes seraient normalement occupés par du Na. A l'opposé, les sites internes auraient une affinité considérable pour le Ca et une affinité négligeable pour le Na. En raison de la basse concentration de Ca ionisé interne, seule une fraction des sites internes serait occupée, malgré leur forte affinité pour le Ca.

Dans l'exemple illustré dans la Fig.32 A, 3 ions Ca internes s'échangent contre 4 ions Na et 1 ion Ca externes (échange Na-Ca et Ca-Ca). Bien que tous les sites externes sont saturés, les sites internes ne le sont que partiellement, de sorte que seuls 3 transporteurs (sur 5) effectuent une translocation ionique.

Dans l'exemple de la Fig.32 B, où le milieu externe est dépourvu en Na, l'efflux total est fortement réduit, puisque l'échange Ca-Na ne peut plus avoir lieu et que seuls certains sites externes sont maintenant occupés par des ions translocables.

La concentration cytoplasmique de Ca ionisé, normalement faible, ne permet pas de saturer tous les sites internes. Lorsque le Ca ionisé dans l'axoplasme est augmenté soit après dépolarisation membranaire en présence de Ca externe, soit après interférence avec la pompe à Ca mitochondriale, l'efflux de Ca augmente comme conséquence de la saturation plus grande des sites internes. Dans cette conditions l'échange Na-Ca est potentialisé (Fig.32 C).

Conclusion

Pour terminer, il nous a paru utile de présenter d'une manière schématique (Fig.33) les processus cellulaires décrits dans ce travail et qui aboutissent à la sécrétion des hormones neurohypophysaires. Lorsque la membrane plasmique d'une terminaison neurosécrétrice est temporairement dépolarisée, du Ca externe pénètre dans les cellules au travers de canaux membranaires.

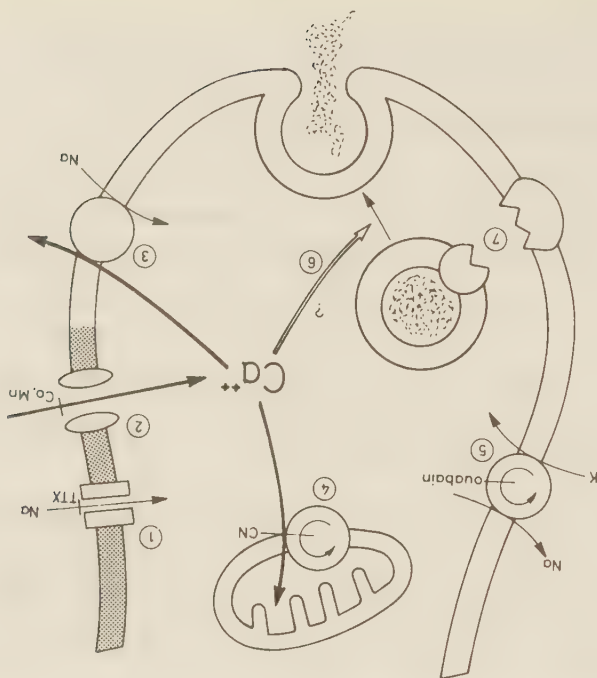


Fig.33. Schéma d'une terminaison neurosécrétoire, où on reconnaît la membrane externe, un granule de neurosécrétion dans le cytoplasme, un granule de neurosécrétion au cours du processus d'exocytose et une mitochondrie. Nous émettons l'hypothèse que la sécrétion hormonale est causée par une élévation de la concentration de Ca ionisé cytoplasmique; celle-ci dépend de l'entrée de Ca au travers de pores membranaires activés par la dépolarisation (2), de l'échange Ca interne- Na externe (3) et de l'accumulation de Ca dans les mitochondries (4). (1), pores sodiques dont la perméabilité dépend du potentiel, pouvant être bloqués par la tétrodotoxine (TTX). (2), pores calciques bloqués en présence de Mn , Co , (4), pompe à calcium mitochondriale, antagonisée par les inhibiteurs métaboliques (CN). (5), pompe à sodium, bloquée par l'ouabaine; (6), par un mécanisme encore inconnu, le Ca ionisé interne favorise l'accolement des granules de neurosécrétion à la membrane cytoplasmique et produit une réorganisation moléculaire au site de fusion qui met le contenu granulaire en continuité avec le milieu externe; des protéines situées sur la membrane des granules de neurosécrétion et sur la membrane plasmatique pourraient intervenir au cours de ce processus (7).

L'augmentation transitoire de Ca ionisé interne qui en résulte favoriserait la fusion des membranes des granules de neurosécrétion et de la membrane plasmatique caractéristique de l'exocytose. Le site et le mode d'action exacts du Ca sont encore mal connus, mais on peut spéculer que le Ca pourrait jouer un rôle de co-facteur dans une réaction enzymatique qui permet l'accolement des granules de neurosécrétion à la cytomembrane et/ou des remaniements des structures membranaires au site d'accolement. La concentration de Ca ionisé cytoplasmique est ramenée à son taux initial après accumulation de Ca dans les mitochondries par un transport qui s'effectue contre un gradient de concentration et/ou après expulsion du Ca excédentaire en échange de sodium externe. L'interférence avec le fonctionnement de la pompe à Ca mitochondriale au moyen des inhibiteurs métaboliques produit une augmentation du Ca ionisé interne, laquelle favorise à son tour le contre-transport Ca interne - Na externe au niveau de la membrane plasmatique. Aussi bien la genèse des potentiels d'action que le fonctionnement de l'échange Ca-Na dépendent en fin de compte du maintien d'un gradient transmembranaire pour le Na.

RESUME

1. La neurohypophyse isolée de rat, incubée in vitro, a servi de modèle expérimental dans une étude sur le rôle du calcium dans les processus de neurosécrétion. Les variations de la concentration axoplasmique de Ca ont été estimées à l'aide de ^{45}Ca et les taux d'hormones sécrétées dosés biologiquement.
2. L'influx de Ca dans la neurohypophyse est accru lors de la dépolarisation membranaire. Pour une même augmentation de la concentration externe de KCl, l'influx de Ca est d'autant plus grand qu'est basse la concentration extracellulaire de Na. L'influx de Ca est réduit en présence de Mn, Co, La ou de la substance D_{600} , mais n'est pas affecté par la tétrodotoxine. Il est conclu de ces résultats qu'il existe une corrélation positive entre les quantités d'hormones sécrétées et l'entrée de Ca dans les terminaisons neurosécrétrices et que la pharmacologie de cet influx de Ca suggère qu'il s'effectue au travers d'un canal membranaire "lent".
3. Le Sr externe peut remplacer le Ca externe dans le couplage dépolarisation-sécrétion.
4. Après stimulation, les quantités d'hormones libérées sont en rapport constant avec les taux de neurophysines immunoréactives qui apparaissent dans l'incubat. Cette observation indique que

la sécrétion s'effectue vraisemblablement par exocytose.

5. L'efflux de ^{45}Ca , qui s'effectue contre un gradient électrochimique, dépend dans une large mesure du gradient de concentration transmembranaire pour le Na. L'acide iodoacétique, le cyanure et le dinitrophénol augmentent l'efflux de Ca. Il est conclu que le Ca entré dans les cellules lors de la dépolarisation peut en être réexpulsé par un mécanisme qui ne dépend pas directement de la présence de composés phosphorylés riches en énergie et que ce mécanisme d'extrusion est aussi activé lorsque la concentration axoplasmique de Ca est accrue après blocage de l'accumulation calcique par les mitochondries.

BIBLIOGRAPHIE

- ACHER, R., CHAUVET, J. et OLIVRY, G. (1956). Sur l'existence éventuelle d'une hormone unique neurohypophysaire. Relation entre l'ocytocine, la vasopressine et la protéine de Van Dyke extraites de la neurohypophyse de boeuf.
Biochim. biophys. Acta, 22, 421-427
- BAKER, P.F. (1970). Sodium-calcium exchange across the nerve cell membrane. In : Calcium and Cellular Function, Cuthbert, A.W., ed., Macmillan, Lond., 96-107
- BAKER, P.F. (1972). Transport and metabolism of calcium ions in nerve.
Prog. Biophys. molec. Biol., 22, 177-224
- BAKER, P.F. and CRAWFORD, A.C. (1972). Mobility and transport of magnesium in squid giant axons.
J. Physiol., 227, 855-874
- BAKER, P.F., HODGKIN, A.L. and RIDGWAY, E.B. (1971a). Depolarization and calcium entry in squid giant axons.
J. Physiol., 218, 109-155
- BAKER, P.F., MEVES, H. and RIDGWAY, E.G. (1971b.) Phasic entry of calcium in response to depolarization of giant axons of Loligo forbesi.
J. Physiol., 216, 70P-71P
- BARGMANN, W. and SCHARER, E. (1951). The site of origin of the hormones of the posterior pituitary.
Amer. Scient., 39, 255-259
- BARKER, J.L., CRAYTON, J.W. and NICOLL, R.A. (1971). Antidromic and orthodromic responses of paraventricular and supraoptic neurosecretory cells.
Brain Research, 33, 353-366
- BISSET, G.W., CLARK, B.J., HALDAR, J., HARRIS, M.C., LEWIS, G.P. and ROCHA e SILVA, M. (1967). The assay of milk-ejecting activity in the lactating rat.
Br. J. Pharmac., 31, 537-549
- BLAUSTEIN, M.O. and HODGKIN, A.L. (1969). The effect of cyanide on the efflux of calcium from squid axons.
J. Physiol., 200, 497-527

- BIAUSTEIN, M.P. and WIESMANN, W.P. (1970). Effect of sodium ions on calcium movements in isolated synaptic terminals.
Proc. nat. Acad. Sci., USA, 66, 664-671
- BORLE, A.B. (1969). Kinetic analysis of calcium movements in beta cell cultures : II. Calcium efflux.
J. gen. Physiol., 53, 57-69
- BRAY, G.A. (1960). A simple efficient liquid scintillation for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter.
Analyt. Biochem., 1, 279-285
- BROOKS, C.McC., ISHIKAWA, T., KOIZUMI, K. and LU, H.H. (1966). Activity of neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and its control.
J. Physiol., 182, 217-231
- BUCHS, M., DREIFUSS, J.J., GRAU, J.D. and NORDMANN, J.J. (1972). Strontium as a substitute for calcium in the process leading to neurohypophyseal hormone secretion.
J. Physiol., 222, 168P-169P
- CHAMBERS, R. and KAO, C.Y. (1952). The effect of electrolytes on the physical state of the nerve axon of the squid and of stentor, a protozoan.
Exp. Cell Res., 3, 564-573
- CHANCE, B. (1965). The energy-linked reaction of calcium with mitochondria.
J. biol. Chem., 240, 2729-2748
- CHENG, K.W., MARTIN, J.B. and FRIESEN, H.G. (1972). Studies of neurophysin release.
Endocrinology, 91, 177-184
- CROSS, B.A. and GREEN, J.D. (1959). Activity of single neurones in the hypothalamus : effect of osmotic and other stimuli.
J. Physiol., 148, 555-569
- DEL CASTILLO, J. and KATZ, B. (1954). The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings.
J. Physiol., 124, 553-559
- DEAN, C.R. and HOPE, D.B. (1968). The isolation of neurophysin I and -II from bovine pituitary neurosecretory granules separated on a large scale from other subcellular organelles.
Biochem. J., 106, 565-573

- DICKER, S.E. (1966). Release of vasopressin and oxytocin from isolated pituitary glands of adult and new-born rats.
J. Physiol., 185, 429-444
- DIXON, W.J. (1951). Ratios involving extreme values.
Ann. Math. Stat., 22, 68-73
- DODGE, F.A., MILEDI, R. and RAHAMIMOFF, R. (1969). Strontium and quantal release of transmitter at the neuromuscular junction.
J. Physiol., 200, 267-283
- DOUGLAS, W.W. (1963). A possible mechanism of neurosecretion : release of vasopressin by depolarization and its dependence on calcium.
Nature, 197, 81-82
- DOUGLAS, W.W. (1968). Stimulus-secretion coupling : the concept and clues from chromaffin and other cells.
Br. J. Pharmac., 34, 451-474
- DOUGLAS, W.W., ISHIDA, A. and POISNER, A.M. (1965). The effect of metabolic inhibitors on the release of vasopressin from the isolated neurohypophysis.
J. Physiol., 181, 753-759
- DOUGLAS, W.W., NAGASAWA, J. and SCHULZ, R. (1971). Electron microscopic studies on the mechanism of secretion of posterior pituitary hormones and significances of microvesicles ("synaptic vesicles") : evidence of secretion by exocytosis and formation of microvesicles as a by-product of this process.
Mem. Soc-Endocr., 19, 353-477
- DOUGLAS, W.W. and POISNER, A.M. (1964a). Stimulus-secretion coupling in a neurosecretory organ : the role of calcium in the release of vasopressin from the neurohypophysis.
J. Physiol., 172, 1-18
- DOUGLAS, W.W. and POISNER, A.M. (1964b). Calcium movements in the neurohypophysis of the rat and its relation to the release of vasopressin.
J. Physiol., 172, 19-30
- DREIFUSS, J.J. (1973). Mécanismes de sécrétion des hormones neurohypophysaires. Aspects cellulaires et sub-cellulaires.
J. Physiol., Paris, 67, 5A-52A

- DREIFUSS, J.J., GRAU, J.D. and BIANCHI, R. (1971). Antagonism between Ca and Na at neurohypophysial nerve terminals.
Experientia, 27, 1295-1296
- EDWARDS, B.A., EDWARDS, N.E. and THORN, N.A. (1973). The release in vitro of vasopressin unaccompanied by the axoplasmic enzymes : lactic acid dehydrogenase and adenylate kinase.
Acta endocr., 72, 417-424
- FAWCETT, C.P., POWELL, A.E. and SACHS, H. (1968). Biosynthesis and release of neurophysin.
Endocrinology, 83, 1299-1310
- FRIESEN, H.G. and ASTWOOD, E.B. (1967). Changes in neurohypophysial proteins induced by dehydration and ingestion of saline.
Endocrinology, 80, 278-287
- GINSBURG, M. and IRELAND, M. (1966). The role of neurophysin in the transport and release of neurohypophysial hormones.
J. Endocr., 35, 289-298
- GRAU, J.D. (1973). Neurosécrétion : rôle du calcium et d'autres ions. Thèse, Faculté de Médecine, Université, Genève.
- HALLER, E.W., SACHS, H., SPERELAKIS, N. and SHARE, L. (1965). Release of vasopressin from isolated guinea pig posterior pituitaries.
Amer. J. Physiol., 208, 214-218
- HEUSER, J. and MILEDI, R. (1971). Effect of lanthanum ions on function and structure of frog neuromuscular junctions.
Proc. R. Soc. B., 179, 247-260
- HODGKIN, A.L. (1964). The conduction of the nervous impulse.
Liverpool University Press 108 pp
- HODGKIN, A.L. and KATZ, B. (1949). The effect of calcium on the axoplasm of giant nerve fibres.
J. exp. Biol., 26, 292-294
- HODGKIN, A.L. and KEYNES, R.D. (1957). Movements of labelled calcium in squid giant axons.
J. Physiol., 138, 253-281

- HOLLENBERG, M.D. and HOPE, D.B. (1968). The isolation of the native hormone-binding proteins from bovine posterior pituitary lobes.
Biochem. J., 106, 557-564
- HUBBARD, J.I. (1970). Mechanism of transmitter release. Progr. Biophys. molec. Biol., 21, 33-124
- ISHIDA, A. (1968). Stimulus-secretion coupling on the oxytocin release from the isolated posterior pituitary lobe.
Jap. J. Physiol., 18, 471-480
- JONES, C.W. and PICKERING, B.T. (1969). Comparison of the effects of water deprivation and sodium chloride imbibition on the hormone content of the neurohypophysis of the rat.
J. Physiol., 203, 449-458
- KALIX, P. (1969). Na-activated calcium efflux in rabbit vagus nerve fibres.
Experientia, 25, 1293-1294
- KATZ, B. (1969). The release of neural transmitter substances.
Liverpool University Press 55 pp
- KATZ, B. and MILEDI, R. (1967a). The timing of calcium action during neuromuscular transmission.
J. Physiol., 189, 535-544
- KATZ, B. and MILEDI, R. (1967b). A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses.
J. Physiol., 192, 407-436
- KELLY, J.S. (1965). Antagonism between Na^+ and Ca^{+2} at the neuromuscular junction.
Nature, 205, 296-297
- KOHLHARDT, M., BAUER, B., KRAUSE, H. and FLECKENSTEIN, A. (1972a). New selective inhibitors of the transmembrane Ca conductivity in mammalian myocardial fibres. Studies with the voltage clamp technique.
Experientia, 28, 288-289
- KOHLHARDT, M., BAUER, B., KRAUSE, H. and FLECKENSTEIN, A. (1972a). Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors.
Pflügers Arch. ges. Physiol., 335, 309-322

- KRISCH, B., BECKER, K. und BARGMANN, W. (1972). Exocytose am Hinterlappen der Hypophyse.
Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 123, 47-54
- LAMB, J.F. and LINDSAY, R. (1971). Effect of Na, metabolic inhibitors and ATP on calcium movements in L-cells.
J. Physiol., 218, 691-708
- LEGROS, J.J., FRANCHIMONT, P. et HENDRICK, J.C. (1969). Dosage radioimmunologique de la neurophysine dans le sérum de femmes normales et de femmes enceintes.
C.R. Séanc. Soc. Biol., 163, 2773-2777
- LEGROS, J.J., STEWART, U., NORDMANN, J.J., DREIFUSS, J.J. et FRANCHIMONT, P. (1971). Libération de vasopressine, d'ocytocine et de neurophysine estimée par méthode radioimmunologique lors de la stimulation in vitro de neurohypophyses de rat.
C.R. Séanc. Soc. Biol., 165, 2443-2447
- LÜTTGAU, H.C. and NIEDERGERKE, R. (1958). The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart.
J. Physiol., 143, 486-505
- MATTHEWS, E.K. (1970). Calcium and hormones release. In Calcium and Cellular Function, A.W. Cuthbert, ed., Lond., Macmillan, 163-182
- MATTHEWS, E.K., LEGROS, J.J., GRAU, J.D., NORDMANN, J.J. and DREIFUSS, J.J. (1973). Release of neurohypophysial hormones by exocytosis.
Nature New Biol., 241, 86-88
- MEIRI, U. and RAHAMIMOFF, R. (1971). Activation of transmitter release by strontium and calcium ions at the neuromuscular junction.
J. Physiol., 215, 709-726
- MEIRI, U. and RAHAMIMOFF, R. (1972). Neuromuscular transmission-inhibition by manganese ions.
Science, 176, 308-309
- MILEDI, R. and SLATER, G.R. (1966). The action of calcium on neuronal synapses in the squid.
J. Physiol., 184, 473-498
- MIKITEN, T.M. and DOUGLAS, W.W. (1965). Effect of calcium and other ions on vasopressin release from rat neurohypophysis stimulated electrically in vitro.
Nature, 207, 302

- NAGASAWA, J., DOUGLAS, W.W. and SCHULZ, R.A. (1970). Ultrastructural evidence of secretion by exocytosis and of "synaptic vesicle" formation in posterior pituitary glands. *Nature*, 227, 407-409
- NORDMANN, J.J., BIANCHI, R., DREIFUSS, J.J. and RUF, K.B. (1971). Release of posterior pituitary hormones from the entire hypothalamo-neurohypophyseal system in vitro. *Brain Research*, 25, 669-671
- POISNER, A.M. and DOUGLAS, W.W. (1968a). Adenosine triphosphate and adenosine triphosphatase in hormone-containing granules of posterior pituitary gland. *Science*, 160, 203-204
- POISNER, A.M. and DOUGLAS, W.W. (1968b). A possible mechanism of release of posterior pituitary hormones involving adenosine triphosphate and an adenosine triphosphatase in the neurosecretory granules. *Molec. Pharmacol.*, 4, 531-540
- POISNER, A.M. and TRIFARO, J.M. (1967). The role of ΔF and ATPase in the release of catecholamines from the adrenal medulla. I. ATP-evoked release of catecholamines, ATP, and protein from isolated chromaffin granules. *Molec. Pharmacol.*, 3, 561-571
- PORTZEHL, H., CALDWELL, P.C. and RUEGG, J.C. (1964). The dependence of contraction and relaxation of muscles fibres from the crab Maia squinado on the internal concentration of free calcium ions. *Biochim. biophys. Acta*, 79, 581-591
- REINHARDT, H.F., HENNING, L.C. und ROHR, H.P. (1969). Morphometrisch-ultrastrukturelle Untersuchungen am Hypophysenhinterlappen der Ratte nach Dehydratation. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, 102, 182-192
- RENNELS, M.L. (1966). A study of proteins of the posterior pituitary of normal and dehydrated rat using disc electrophoresis. *Endocrinology*, 78, 659-660
- REUTER, H. (1973). Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. *Progr. Biophys. molec. Biol.*, 26, 3-43

- REUTER, H. and SEITZ, N. (1968). The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition.
J. Physiol., 195, 451-470
- RUBIN, R.P. (1970). The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones.
Pharmac. Rev., 22, 389-428
- SACHS, H. (1970a). Neurosecretion.
Handb. Neurochem., 4, 373-428
- SCHATZMANN, H.J. and VINCENZI, F.F. (1969). Calcium movements across the membrane of human red cells.
J. Physiol., 201, 369-395
- SCHNEIDER, F.H., SMITH, A.D. and WINKLER, H. (1967). Secretion from the adrenal medulla : biochemical evidence for exocytosis.
Br. J. Pharmac., 31, 94-104
- SHAW, T.I. and NEWBY, E. (1972). Movement in a ganglion.
Biochim. biophys. Acta, 225, 441-442
- SKOU, J.C. (1971). Sequence of steps in the (Na+K)-activated enzyme system in relation to sodium and potassium transport.
Current Topics in Bioenergetics, 4, 357-398
- SMITH, A.D. (1971). Some implications of the neuron as a secreting cell.
Phil. Trans. R. Soc. B, 261, 423-437
- SMITH, A.D. and WINKLER, H. (1972). Fundamental mechanisms in the release of catecholamines.
Handb. exp. Pharm., 33, 538-617
- STAHL, W.L. and SWANSON, P.D. (1972). Calcium movements in brain slices in low sodium or calcium media.
J. Neurochem., 19, 2395-2407
- UTTENTHAL, L.O., LIVETT, B.G. and HOPE, D.B. (1971). Release of neurophysin together with vasopressin by a Ca^{2+} dependent mechanism.
Phil. Trans. R. Soc. B, 261, 379-380
- VILHARDT, H. and JØRGENSEN, T. (1972). Free flow electrophoresis of isolated secretory granules from bovine neurohypophyses.
Experientia, 28, 832

- WATKINS, W.B. and EVANS, J.J. (1972). Demonstration of neurophysin in the hypothalamo-neurohypophysial system of the normal and dehydrated rat by the use of cross-species reactive anti-neurophysins. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 131, 149-170
- WEINSTEIN, H., MALAMED, S. and SACHS, H. (1961). Isolation of vasopressin-containing granules from the neurohypophysis of the dog. Biochim. biophys. Acta, 50, 386-389
- WILBRANDT, W. und KOLLER, H. (1948). Die Calcium-Wirkung am Froschherzen als Funktion des Ionen-gleichgewichts zwischen Zellmembran und Umgebung. Helv. physiol. Acta, 6, 208-221

